

UNIVERSIDAD RICARDO PALMA

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

ESCUELA PROFESIONAL DE BIOLOGÍA



**ELABORACIÓN DE CONSTRUCTOS
GENÉTICOS PARA LA EXPRESIÓN SOLUBLE
DE FimH DE *Salmonella enterica* serovar
Typhimurium**

Tesis para optar el Título Profesional de
Licenciada en Biología

Cindy Lee Cajachagua Pucuhuaranga

Lima, Perú

2018

DEDICATORIA

Dedico el presente trabajo a mis amados padres, Teresa Nilda Pucuhuaranga Espinoza y Cirilo Cajachagua Güere quienes son los responsables de manera directa o indirecta de todos los momentos felices de mi vida; y a quien fue como una segunda madre para mí durante siete años, Liliana Marlene Villanueva Espinoza.

AGRADECIMIENTOS

La presente Tesis no es el resultado de un trabajo individual, sino de un trabajo colectivo en el cual han colaborado personas ya sea de manera intelectual, planteando posibles experimentos; o emocional, con palabras de aliento y/o consejos ante momentos de frustración.

La presente Tesis no es el resultado de un trabajo individual, sino de un trabajo colectivo en el cual han intervenido personas que colaboraron de manera intelectual o emocional con palabras de aliento y/o consejos ante momentos de frustración.

A mi directora de Tesis la Doctora Andrea Balan Fernandes quien me apoyó capacitándome en la Universidad de São Paulo en expresión y purificación de proteínas y me brindó las facilidades para utilizar los reactivos y equipos del Laboratorio de Biología Estructural Aplicada (LBEA) y a mis compañeros de dicho laboratorio (Lilia, Sindy, Larissa, Sair, Fernanda, Ana, Priscila, Pamela, Gabriel, Pedro, Natalia y Renata) quienes me tuvieron paciencia y me brindaron su amistad.

A mi asesor de Tesis el Biólogo Roberto Pineda Chavarria quien me orientó realizando correcciones en la Tesis.

Al Doctor Mauro Quiñones Aguilar, a la Doctora Lidia Cruz Neyra y al Doctor Hugo Gonzales Figueroa, quienes con sus cátedras despertaron en mí la pasión por la ciencia e investigación.

Al Biólogo Alcides Guerra Santa Cruz y al grupo de compañeros del Laboratorio de Microbiología (Santiago, Tania, Carla, María, Marlon, Miguel Mt., Miguel Mr., Luis, Diego, Claudia, Olmo, Pavel, Janny, Roma y Miguel G.) con quienes desarrollé mis primeros trabajos de investigación extracurricular y comencé a leer y discutir papers sobre ciencia básica y problemática peruana actual.

Al PhD(c) Santiago Justo Arévalo por confiar en mí para desarrollar su idea de clonar, expresar y purificar la proteína fimbrial FimH de *Salmonella* (una de las proteínas de interés del Grupo de Bioinformática y Sistemas Complejos) y quién también me oriento durante el desarrollo experimental de la Tesis.

A mi familia; mis padres, Teresa Pucuhuaranga Espinoza y Cirilo Cajachagua Güere, quienes siempre me han apoyado y han estado junto a mí en llantos y decepciones, y quienes de un modo poco convencional me ha corregido haciendo de mí una mejor persona cada día, y a quienes debo de manera directa o indirecta todos los momentos felices de mi vida; y a mi hermana Ketty Cajachagua Pucuhuaranga cuya autoexigencia y empeño me demuestran que uno puede hacer que las imposibilidades de la vida sean posibles. También a mi tía Liliana, a mis primas Jazmín y Emily, y a mi abuelito Vidal con quienes compartí risas durante los cinco años de la carrera universitaria.

A mis amigos (Teresa, Paola, Miguel, Kanie, Jennifer, Brigitte, María, Raúl, Emilio, Ivan, Victor, Brenda D., Brenda H. y Andrea V.) quienes me hacen reír, me regañan y me enseñan mucho a nivel personal.

ÍNDICE

| | | |
|---|---|----|
| AGRADECIMIENTOS | 3 | |
| ÍNDICE | 5 | |
| ÍNDICE DE FIGURAS | 8 | |
| ÍNDICE DE TABLAS | 10 | |
| RESUMEN..... | 13 | |
| ABSTRACT..... | 14 | |
| I. INTRODUCCIÓN | 15 | |
| II. ANTECEDENTES..... | 17 | |
| 2.1 Generalidades de <i>Salmonella enterica</i> ser. Typhimurium..... | 17 | |
| 2.1.1 Taxonomía de <i>Salmonella enterica</i> ser. Typhimurium..... | 17 | |
| 2.1.2 Características de <i>Salmonella enterica</i> ser. Typhimurium | 18 | |
| 2.2 Fimbrias en el mecanismo de infección de <i>Salmonella</i> | 19 | |
| 2.2.1 FimH de <i>Salmonella</i> en la colonización..... | 20 | |
| 2.3 Expresión soluble de proteínas recombinantes | 20 | |
| 2.3.1 Expresión soluble de proteínas y su relación con la biología estructural | 21 | |
| 2.3.2 Resolución de la estructura 3D de proteínas y su relación con el | desarrollo de una vacuna eficiente contra <i>Salmonella</i> | 21 |
| 2.3.3 Estudios estructurales de FimH..... | 22 | |
| 2.4 Tecnología de ADN recombinante..... | 23 | |
| 2.4.1 Elaboración de constructos genéticos para expresar proteínas | recombinantes | 24 |
| 2.4.2 Constructos genéticos para expresar solublemente proteínas de | <i>Salmonella</i> | 24 |
| III. MATERIALES Y MÉTODOS | 26 | |
| 3.1 Lugar de investigación | 26 | |
| 3.2 Adquisición de kits, plásmidos y cepa | 26 | |
| 3.3 Elaboración <i>in silico</i> de constructos genéticos de <i>fimH</i> | 26 | |

| | | |
|-------|---|----|
| 3.4 | Clonación <i>in vitro</i> de las secuencias nucleotídicas de <i>fimH</i> en los plásmidos pET28a ⁺ y pET-DUET..... | 28 |
| 3.5 | Inducción de la expresión de los constructos elaborados en cepas de expresión..... | 29 |
| 3.6 | Determinación de la solubilidad de los fragmentos proteicos de FimH. | 29 |
| IV. | RESULTADOS..... | 31 |
| 4.1 | Elaboración <i>in silico</i> de constructos genéticos..... | 31 |
| 4.1.1 | Reconocimiento de la secuencia nucleotídica de <i>fimH</i> y secuencia proteica de FimH..... | 31 |
| 4.1.2 | Análisis <i>in silico</i> de la secuencia proteica de FimH..... | 32 |
| 4.1.3 | Determinación de las secuencias nucleotídicas a clonar en los plásmidos en los plásmidos pET-DUET y pET28a ⁺ | 37 |
| 4.1.4 | Clonación <i>in silico</i> de las secuencias nucleotídicas de interés de <i>fimH</i> en los plásmidos pET28a ⁺ y pET-DUET..... | 40 |
| 4.2 | Clonación <i>in vitro</i> de las secuencias nucleotídicas de interés de <i>fimH</i> en los plásmidos pET28a ⁺ y pET-DUET..... | 40 |
| 4.2.1 | Amplificación de las secuencias nucleotídicas de interés del genoma de <i>S. Typhimurium</i> | 41 |
| 4.2.2 | Confirmación de ligación de las secuencias nucleotídicas de interés en los plásmidos pET-DUET o pET28a ⁺ | 41 |
| 4.3 | Expresión de los constructos elaborados en diferentes cepas de expresión. | 42 |
| 4.4 | Determinación de la solubilidad de la proteína o fragmentos proteicos de FimH | 43 |
| V. | DISCUSIÓN | 44 |
| 5.1 | Análisis <i>in silico</i> de FimH de <i>S. Typhimurium</i> | 44 |
| 5.2 | Elaboración de constructos genéticos para expresar solublemente FimH | 45 |
| 5.3 | Elaboración de constructos genéticos para expresar solublemente proteínas de <i>Salmonella</i> | 46 |
| VI. | CONCLUSIONES | 48 |

| | | |
|-------|---------------------------|----|
| VII. | RECOMENDACIONES | 50 |
| VIII. | REFERENCIAS CITADAS | 51 |
| IX. | ANEXOS | 56 |
| 9.1. | FIGURAS..... | 56 |
| 9.2. | TABLAS | 67 |
| 9.3. | GRÁFICOS | 68 |

ÍNDICE DE FIGURAS Y GRÁFICOS

| | |
|--|----|
| Figura N°1. Identificación de dominios de la proteína FimH de <i>S. Typhimurium</i> . | 56 |
| Figura N°2. Comparación de los dominios de FimH de <i>E.coli</i> y <i>S. Typhimurium</i> . | 56 |
| Figura N°3. Identificación del péptido señal de FimH de <i>S. Typhimurium</i> . | 57 |
| Figura N°4. Identificación de regiones transmembrana de FimH de <i>S. Typhimurium</i> . | 57 |
| Figura N°5. Identificación de regiones intrínsecamente desordenadas de FimH de <i>S. Typhimurium</i> . | 58 |
| Figura N°6. Modelos de SWISS-MODEL. | 58 |
| Figura N°7. Modelos de Phyre2. | 59 |
| Figura N°8. Comparación de los modelos estructurales generados de FimH de <i>S.Typhimurium</i> con una estructura resuelta de <i>E.coli</i> . | 60 |
| Figura N°9. Co-expresión de FimH con un péptido de FimF. | 61 |
| Figura N°10. Determinación de las secuencias nucleotídicas a clonar en los plásmidos pET-DUET y pET28a ⁺ . | 61 |
| Figura N°11. Construcción <i>in silico</i> de los plásmidos. | 62 |
| Figura N°12. Corrida electroforética de las secuencias nucleotídicas de interés del genoma de <i>S. Typhimurium</i> . Carril 1: Marcador de 10 000pb (MassRuler™ DNA Ladder mix), carril 2: amplicón de <i>fimH</i> _{25-335FL} (955 pb), carril 3: amplicón de <i>dsF</i> (81 pb), carril 4: amplicón de <i>fimH</i> _{187-335PD} (466 pb) y carril 5: amplicón de <i>fimH</i> _{25-186LD} (510 pb). | 62 |
| Figura N°13. Corrida electroforética de las secuencias nucleotídicas de interés de los plásmidos construidos. Carril 1: Marcador de 10 000pb (MassRuler™ DNA Ladder mix), carril 2: amplicones de <i>fimH</i> _{25-335FL} (955 pb) y <i>dsF</i> (81 pb), carril 3: amplicones de <i>fimH</i> _{187-335PD} (466 pb) y <i>dsF</i> (81 pb) y carril 4: amplicón de <i>fimH</i> _{25-186LD} (510 pb). | 63 |
| Figura N°14. Corte con enzimas de restricción de los plásmidos construidos. Carril 1: Marcador de 10 000pb (MassRuler™ DNA Ladder mix), carril 2: banda correspondiente a <i>fimH</i> _{25-186LD} (492 pb), carril 3: bandas correspondientes a <i>fimH</i> _{25-335FL} (937 pb) y <i>dsF</i> (63 pb), carril 4: bandas correspondientes a <i>fimH</i> _{187-335PD} (448 pb) y <i>dsF</i> (63 pb). | 63 |
| Figura N°15. Ensayos de expresión de la proteína FimH _{25-335FL} . Carril 1, 4, 7 y 10 (M(Kda)): Marcador de 10 000pb (MassRuler™ DNA Ladder mix), carril 2,5,8 y 11 (UI): Expresión en cepas no inducidas, carril 3,6,9 y 12: Expresión en cepas inducidas. | 64 |
| Figura N°16. Ensayos de expresión de la proteína FimH _{187-335PD} . Carril 1, 4, 7 y 10 (M(Kda)): Marcador de 10 000pb (MassRuler™ DNA Ladder mix), carril 2,5,8 y 11 (UI): Expresión en cepas no inducidas, carril 3,6,9 y 12: Expresión en cepas inducidas. | 64 |

| | |
|---|----|
| Figura N°17. Ensayos de expresión de la proteína FimH_{25-186LD}. Carril 1, 4, 7 y 10 (M(Kda)): Marcador de 10 000pb (MassRuler™ DNA Ladder mix), carril 2,5,8 y 11 (UI): Expresión en cepas no inducidas, carril 3,6,9 y 12: Expresión en cepas inducidas. | 65 |
| Figura N°18. Ensayos de solubilidad de la proteína FimH_{25-335FL}. M(Kda): Marcador de 10 000pb (MassRuler™ DNA Ladder mix), UI: Expresión de cepas no inducidas, I: Expresión de cepas inducidas, S: Fracción soluble y P: Fracción insoluble. | 66 |
| Figura N°19. Ensayos de solubilidad de la proteína FimH_{187-335PD}. M(Kda): Marcador de 10 000pb (MassRuler™ DNA Ladder mix), UI: Expresión de cepas no inducidas, I: Expresión de cepas inducidas, S: Fracción soluble y P: Fracción insoluble. | 66 |
| Figura N°20. Ensayos de solubilidad de la proteína FimH_{25-186LD}. M(Kda): Marcador de 10 000pb (MassRuler™ DNA Ladder mix), UI: Expresión de cepas no inducidas, I: Expresión de cepas inducidas, S: Fracción soluble y P: Fracción insoluble. | 67 |
| Gráfico N°1. Incidencia de outbreaks transmitidos por alimentos. | 68 |
| Gráfico N°2. Alimentos que originan los brotes causados por Salmonella en la Unión Europea (A) y Estados Unidos (B). | 69 |
| Gráfico N°3. Secuenciamiento del gen <i>fimH_{24-186LD}</i> . | 69 |
| Gráfico N°4. La mutación G348A del gen <i>fimH_{24-186LD}</i> es una mutación silenciosa. | 71 |
| Gráfico N°5. El secuenciamiento de dsF no fue factible. | 71 |

ÍNDICE DE TABLAS

| | |
|--|----|
| Tabla N°1. <i>Tipos de fimbrias reportadas en Salmonella.</i> | 67 |
| Tabla N°2. <i>Listado de primers utilizados</i> | 67 |
| Tabla N°3. <i>Características de los fragmentos proteicos</i> | 68 |

LISTA DE ABREVIATURAS

A: Alanina

aa: Aminoácidos

Ala1: Alanina en posición 1

APC: Célula presentadora de antígeno

Asn8: Asparagina en posición 8

Asp2: Aspartato en posición 2

Asp: Aspartato

C: Cisteína

D: Aspartato

DsF: Péptido de FimF

dsF: Secuencia nucleotídica del péptido DsF

E: Ácido glutámico

F: Fenilalanina

FimH_{FL}: Proteína FimH con los dominios de pilina y lectina

FimH_{LD}: Dominio de lectina de FimH

FimH_{PD}: Dominio de pilina de FimH

FimH_{25-335FL}: Secuencia 25-335aa de FimH

FimH_{187-335PD}: Secuencia 187-335aa de FimH

FimH_{25-186LD}: Secuencia 25-186aa de FimH

*fimH*_{25-335FL}: Secuencia nucleotídica correspondiente a la secuencia 25-335aa de FimH

*fimH*_{187-335PD}: Secuencia nucleotídica correspondiente a la secuencia 187-335aa de FimH

*fimH*_{25-186LD}: Secuencia nucleotídica correspondiente a la secuencia 25-186aa de FimH.

G: Glicina

Gly9: Glicina en posición 9

H: Histidina

I: Isoleucina

Ile5: Isoleucina en posición 5

K: Lisina

Lys10: Lisina en posición 10

M: Metionina

MHC: Complejo Mayor de Histocompatibilidad

nt: Nucleótidos

N: Asparagina

L: Leucina

pFimH_{25-335FL}-DsF: Plásmido de co-expresión de FimH_{25-335FL} y DsF

pFimH_{187-335PD}-DsF: Plásmido de co-expresión de FimH_{187-335PD} y DsF

pFimH_{25-186LD}: Plásmido de expresión de FimH_{25-186LD}.

pI: Punto Isoeléctrico

PMSF: Fluoruro de fenilmetilsulfonilo

P: Prolina

R: Arginina

S: Serina

SE: *Salmonella enterica* serovar Enteritidis

S. Typhimurium: *Salmonella enterica* serovar Typhimurium

TCR: Receptores de linfocitos T

T: Treonina

Thr4: Treonina en posición 4

Thr6: Treonina en posición 6

Tyr: Tirosina

UPEC: *Escherichia Coli* Uropatogénica

V: Valina

Val3: Valina en posición 3

Val7: Valina en posición 7

Val11: Valina en posición 11

Val12: Valina en posición 12

WT: Wild Type

Y: Tirosina

3D: Tridimensional

RESUMEN

Salmonella enterica serovar Typhimurium es una bacteria que frecuentemente produce infección en los seres humanos, siendo las aves y huevos infectados los principales vehículos de transmisión. Para lidiar con este problema es necesario el desarrollo de una vacuna eficiente para aves contra *S. Typhimurium*, el cual está relacionado con el conocimiento de la estructura tridimensional de todas las proteínas asociadas a la virulencia del patógeno, como FimH; una adhesina que permite la unión del patógeno a la célula huésped. El primer paso para resolver la estructura tridimensional de FimH de *S. Typhimurium* mediante cristalografía es la obtención de proteína soluble, por ello en el presente trabajo se realizó un análisis *in silico* de la secuencia proteica de FimH utilizando herramientas y programas bioinformáticos online con la finalidad de elaborar constructos genéticos de expresión *in vitro* que permitan obtener fragmentos proteicos de FimH solubles. Los resultados del análisis *in silico* postularon la idea de que FimH tiene dos dominios: un dominio de lectina (25-186aa) y un dominio de pilina (187-335aa), además se logró elaborar 3 constructos genéticos *in vitro* (pFimH_{25-335FL}-DsF, pFimH_{187-335PD}-DsF, pFimH_{25-186LD}), el primer y segundo constructo (pFimH_{25-335FL}-DsF, pFimH_{187-335PD}-DsF) fueron de co-expresión y contenían las secuencias nucleotídicas de *fimH*_{25-335FL} y *fimH*_{187-335PD} respectivamente conjuntamente con la secuencia nucleotídica de *dsF*; y el tercer constructo (pFimH_{25-186LD}) fue de expresión y contenía la secuencia nucleotídica de *fimH*_{25-186LD}, las secuencias nucleotídicas de *fimH*_{25-335FL}, *fimH*_{187-335PD} y *fimH*_{25-186LD} fueron confirmadas mediante secuenciamiento. Luego de los ensayos de expresión se determinó que todas las proteínas de interés (FimH_{25-335FL}, FimH_{187-335PD} y FimH_{25-186LD}) se expresaban en las cepas BL21(DE3), TUNER, ARTIC y Rosetta, asimismo luego de los ensayos de solubilidad se logró obtener FimH_{25-186LD} soluble en la cepa BL21(DE3).

Palabras clave: *S. Typhimurium*, FimH, *in silico*, *in vitro*, clonación, secuenciamiento, expresión, solubilidad.

ABSTRACT

Salmonella enterica serovar Typhimurium is a bacteria that frequently causes infection in humans, birds and eggs infected are the main transmission vehicles. To deal with this problem it is necessary to develop an efficient vaccine for birds against *S. Typhimurium*, which is related to the knowledge of the three-dimensional structure of all the proteins associated with the virulence of the pathogen, such as FimH; an adhesin that allows the union of the pathogen to the host cell. The first step to solve the three-dimensional structure of FimH of *S. Typhimurium* by crystallography is obtaining soluble protein, therefore in the present investigation an *in silico* analysis of the protein sequence of FimH was carried out using online bioinformatics tools and programs with the purpose to elaborate genetic constructs of expression *in vitro* that allow to obtain protein fragments of FimH soluble. The results of the *in silico* analysis postulated the idea that FimH has two domains: a lectin domain (25-186aa) and a pilin domain (187-335aa), besides, three genetic constructs *in vitro* were elaborated (pFimH_{25-335FL}-DsF, pFimH_{187-335PD}-DsF, pFimH_{25-186LD}), the first and second constructs (pFimH_{25-335FL}-DsF, pFimH_{187-335PD}-DsF) were for co-expression and contained the nucleotide sequences of *fimH*_{25-335FL} and *fimH*_{187-335PD} respectively in conjunction with the nucleotide sequence of *dsF*; and the third construct (pFimH_{25-186LD}) was for expression and contained the nucleotide sequence of *fimH*_{25-186LD}, the nucleotide sequences of *fimH*_{25-335FL}, *fimH*_{187-335PD} and *fimH*_{25-186LD} were confirmed by sequencing. After the expression assays it was determined that all the proteins of interest (FimH_{25-335FL}, FimH_{187-335PD} and FimH_{25-186LD}) were able to express in strains BL21 (DE3), TUNER, ARTIC and Rosetta, similarly after to perform the solubility tests, soluble FimH_{25-186LD} was obtained in strain BL21 (DE3).

Key words: *S. Typhimurium*, FimH, *in silico*, *in vitro*, cloning, sequencing, expression, solubility.

I. INTRODUCCIÓN

Salmonella es un género bacteriano de importancia en la salud humana porque produce la enfermedad denominada salmonelosis en decenas de millones de personas anualmente y provoca más de cien mil muertes, generando pérdidas económicas en salud pública. *Salmonella enterica* serovar Typhimurium junto con *Salmonella enterica* serovar Enteritidis son las serovariedades más frecuentes en los casos de salmonelosis.

Los vehículos de transmisión de *Salmonella* más importantes son los huevos y la carne de aves de corral. Aves y huevos infectados no pueden comercializarse para consumo, por ello un mal control de *Salmonella* en las industrias avícolas origina pérdidas económicas.

Hasta el momento las industrias avícolas no alcanzan el 100% de control de *Salmonella*. La vacunación es una herramienta que puede prevenir la colonización de *Salmonella* permitiendo controlar el problema desde su inicio; sin embargo, las vacunas actuales no reducen al 0% la colonización en aves infectadas. Para el desarrollo de una vacuna eficiente se debe conocer la estructura tridimensional (3D) de todas las proteínas relacionadas a la virulencia del patógeno, para así reconocer los epítopes antigénicos que generan respuesta celular y/o humoral y luego realizarle algunas modificaciones aumentando su carácter antigénico. Una proteína importante en la virulencia de *Salmonella* es FimH, proteína ubicada en la punta de la fimbria que corresponde a una adhesina y que se une a residuos de manosa de glicoproteínas ubicadas en la superficie de células eucariotas colaborando en la colonización del patógeno.

Las investigaciones sobre la estructura 3D de FimH de *Salmonella* realizadas hasta ahora son *in silico* y sus resultados no son concluyentes debido a que toman como base la estructura de FimH de *Escherichia coli* con la cual solo tiene el 15% de homología. Tener la estructura 3D resuelta experimentalmente de FimH de

Salmonella proporcionaría información más exacta de la posición de sus epitopes, para resolver esta estructura 3D mediante cristalografía el primer paso es lograr su expresión soluble.

El objetivo principal de este proyecto es elaborar constructos genéticos para obtener FimH de *Salmonella enterica* serovar *Typhimurium* soluble.

II. ANTECEDENTES

2.1 Generalidades de *Salmonella enterica* ser. Typhimurium

2.1.1 Taxonomía de *Salmonella enterica* ser. Typhimurium

Según el sistema de clasificación del Centro de Control y Prevención de Enfermedades (CDC- Centers for Disease Control and Prevention) el género *Salmonella* tiene dos especies: *S. enterica* y *S. bongori*, además *S. enterica* se divide en seis subespecies (I, *enterica*; II, *salamae*; IIIa, *arizonae*; IIIb, *diarizonae*; IV, *houtenae* y VI, *indica*) y a su vez la subespecie entérica cuenta con varios serovares, entre ellos los más conocidos son: Enteritidis, Typhimurium, Typhi y Choleraesuis (Brenner *et al.* 2000), de esta manera *Salmonella enterica* ser. Typhimurium tiene la siguiente clasificación taxonómica.

Dominio: Bacteria

Filo: Proteobacteria

Clase: Gammaproteobacteria

Orden: Enterobacteriales

Familia: Enterobacteriaceae

Género: *Salmonella* (Lignieres, 1900)

Especie: *Salmonella enterica*

Subespecie: *Salmonella enterica* subsp. *enterica*

Serovar (serotipo): *Salmonella enterica* subsp. *enterica* Serovar Typhimurium

2.1.2 Características de *Salmonella enterica* ser. Typhimurium

Salmonella enterica ser. Typhimurium son bacterias Gram-negativas, en forma de bacilo y son anaeróbicas facultativas (Zeiner *et al.* 2012). Son organismos quimio-organotróficas con la capacidad de metabolizar nutrientes por vías respiratorias y fermentativas, crecen de manera óptima a 37 °C y catabolizan D-glucosa y otros carbohidratos, con la producción de ácido y gas (Doyle y Buchanan, 2013).

El género *Salmonella* es el primer agente conocido con mayor incidencia en número de outbreaks transmitidos por alimentos (EFSA y ECDC, 2015) (Gráfico N°1), siendo *Salmonella enterica* ser. Enteritidis y *Salmonella enterica* ser. Typhimurium los serovares más frecuentes (Arnedo, 2017). Las aves de corral y los huevos son los vehículos alimentarios que originan la mayoría de brotes causados por *Salmonella* en la Unión Europea (E.U.) y Estados Unidos (E.E.U.U.): En la E.U el 46,1% de casos de infección se originó por la ingestión de huevos y productos derivados de huevos y el 2,8% a la carne de pollo y productos derivados, siendo en conjunto el 50% (WHO, FAO 2002; CDC, 2009; Doyle y Buchanan 2013, EFSA y ECDC, 2015) (Gráfico N°2A), y en los E.E.U.U el 29% de casos de infección se originó por la ingestión de aves de corral y el 18% por huevos, sumando en conjunto el 47% (CDC, 2009) (Gráfico N°2B).

El año 2007 la Organización Mundial de la Salud (OMS) realizó una evaluación de riesgos sobre salmonelosis y se identificó una relación entre la prevalencia de infección por *Salmonella* en aves de corral y los casos humanos de salmonelosis, en base a este resultado se concluyó que la reducción en las tasas de infección por *Salmonella* en aves de corral conduciría a una reducción directa de la enfermedad en humanos.

2.2 Fimbrias en el mecanismo de infección de *Salmonella*

Para el desarrollo de una enfermedad bacteriana es necesaria que se lleve a cabo un proceso de infección, el cual cuenta con los siguientes pasos: adhesión (interacción entre hospedero-microorganismo), invasión, replicación, resistencia a los mecanismos de defensa del hospedero y finalmente daño al hospedero (Figuroa y Verdugo, 2005). La adhesión a la célula huésped es un mecanismo de infección, en *Salmonella* es realizada por moléculas de superficie, organelas y maquinarias, tales como fimbrias, flagelos y sistemas de secreción de tipo 3 (T3SS) que hacen posible el contacto con las células huésped y el suministro de moléculas que ayuden a la posterior colonización, invasión y transmisión a nuevos huéspedes (Yue y Schifferli 2014, Olbertz *et al.* 2015), por ello las fimbrias son consideradas factores de virulencia importantes en la patogénesis de *Salmonella* (Dufresne y Daigle, 2017).

Las fimbrias se organizan en grupos de genes, de cuatro a quince genes, que codifican proteínas estructurales, de ensamblaje y reguladoras. Hay tres tipos de fimbrias de acuerdo a su ensamblaje: Las fimbrias chaperona/ujier (CU), las fimbrias nucleación/precipitación y fimbrias de tipo IV que requieren un aparato transmembrana y ATP para energizar la reacción (Dufresne y Daigle, 2017). *Salmonella* expresa una amplia variedad de fimbrias con diferente especificidad de unión (Tabla N°1) (Figuroa y Verdugo, 2005). Varias fimbrias se conservan entre los serovares de *Salmonella*, mientras que algunas están presentes en un conjunto limitado o sólo serovares específicos, sin embargo el grupo de genes *fim* que codifica las fimbrias de tipo 1 se encuentra en la mayoría de serovares y es ampliamente estudiado, y presenta su propio conjunto de reguladores (Dufresne y Daigle, 2017). La fimbria tipo 1 que está constituida por lo general por cuatro subunidades diferentes (FimA, FimF, FimG y FimH), alrededor de 1000 subunidades de FimA se enrollan helicoidalmente seguidos de una copia de FimG y FimF, y un extremo distal de adhesina FimH, estas subunidades son ensambladas por la vía chaperona/ujier (Fronzes *et al.* 2008, Bush y Waksman, 2012, Thanassi *et al.* 2012 y Bush *et al.* 2015).

2.2.1 FimH de *Salmonella* en la colonización

La subunidad FimH de la fimbria tipo 1 es la responsable de la adhesión a las células huésped mediante su unión a los residuos de manosa de la célula huésped; por lo tanto, cualquier variación de alelo o mutación puntual que cambie la estructura de FimH modificará su adherencia y especificidad a la célula huésped (Singh, 2013), esto también fue confirmado mediante investigaciones experimentales: Guo *et al.* 2009 utilizaron las cepas de *S. Typhimurium* AJB3 y SL1344 que difieren en solo un aminoácido Asp158Tyr en la secuencia proteica de FimH y demostraron que solo la cepa AJB3 se unía eficientemente a las células de mamífero (células dendríticas-CD y células HEp-2). Dwyer *et al.* 2011 evidenciaron que los polimorfismos en un solo nucleótido (SNP- Single nucleotide polymorphisms) de la proteína FimH en cepas de *S. Typhimurium* determinaban su adherencia a eritrocitos y/o células HEp-2 o la no adherencia. Asimismo en la investigación de Zeiner *et al.* 2012 realizaron deleciones de algunos genes (fimA, fimI, fimH y fimF) de *S. Typhimurium* y al comparar estos resultados con estudios en *Escherichia* determinaron que FimF y FimH eran necesarios para ensamblar la fimbria de *S. Typhimurium* y por lo tanto para su adhesión al huésped, pero que no eran necesarios para ensamblar la fimbria de *E. coli* que podía realizarlo en ausencia de estas proteínas, estos resultados sugerían que a pesar que ambas bacterias utilicen la vía chaperona/ujier el sistema de ensamblaje de estas bacterias es diferente.

2.3 Expresión soluble de proteínas recombinantes

La expresión soluble de proteínas recombinante es fundamental para el desarrollo de investigaciones en biotecnología, debido a que facilita la obtención de proteínas puras en alta concentración, las cuales luego pueden ser empleadas para realizar estudios estructurales o funcionales de la proteína, o para su posible uso terapéutico (Kramer *et al.* 2012, Chan *et al.* 2013).

2.3.1 Expresión soluble de proteínas y su relación con la biología estructural

En el campo de biología estructural, una de las técnicas más empleadas para resolver la estructura 3D de una proteína es cristalografía de rayos X; técnica que a una resolución suficientemente alta proporciona las coordenadas de los átomos y que depende de la formación cristales (Michael, 2011), siendo el primer paso para formar buenos cristales es la obtención de proteína soluble en gran concentración (Song, 2009).

2.3.2 Resolución de la estructura 3D de proteínas y su relación con el desarrollo de una vacuna eficiente contra *Salmonella*

La Organización Mundial de la Salud (OMS) 1998, con la finalidad de disminuir la contaminación vertical, reconoció los programas de vacunación como parte de una estrategia de control global del género *Salmonella* en animales que forman parte de nuestra alimentación, como los pollos.

De acuerdo a una revisión realizada por Desin *et al.* 2013 todas las vacunas contra *Salmonella* en aves de corral desarrolladas hasta el momento se dividen en 3 categorías: vacunas inactivadas, vacunas vivas atenuadas y vacunas de subunidades, concluyen que a pesar de los numerosos estudios todavía existe la necesidad de desarrollar vacunas más seguras y bien definidas. De acuerdo a Agudelo y Patarroyo M., 2010 para desarrollar una vacuna eficiente se debe estimular una respuesta inmune adecuada mediada por interacciones moleculares con diferentes tipos de células. Entre ellos, se ha demostrado que la unión de péptidos antigénicos a la molécula del Complejo Mayor de Histocompatibilidad (MHC) expresada en la membrana de las células presentadoras de antígeno (APC) y su posterior reconocimiento

por el receptor de células T es crucial. En otra investigación realizada por Patarroyo M. *et al.* 2015 concluyeron que para desarrollar vacunas lógicas y racionales se debe tener toda la información estructural en 3D de las moléculas del patógeno involucradas en la invasión de las células huésped para luego identificar los epitopes, hacer modificaciones y hacerlas altamente inmunógenas y protectoras denominadas, péptidos modificados con alta actividad de unión (mHABPs- modified high activity binding peptides), así mismo es importante conocer la estructura en 3D del complejo de histocompatibilidad II (MHCII) y receptores de linfocitos T (TCR).

2.3.3 Estudios estructurales de FimH

Hasta el momento en el PDB (Protein Data Bank) hay 65 estructuras 3D resueltas que tienen la subunidad FimH, sin embargo todas corresponden a FimH de *Escherichia coli*, una de esas estructuras corresponde a los resultados de la investigación realizada por Sauer *et al.* 2016 en el que hicieron estudios sobre el tipo de regulación alostérica catch-bound que tiene la proteína FimH de *Escherichia Coli* Uropatogénica (UPEC) en su unión con residuos de manosa y que está relacionada con la permanencia de la infección urinaria, los resultados demuestran que en ausencia de fuerza de tracción el dominio de la pilina de FimH acelera alostéricamente la disociación del dominio de la lectina de FimH de los residuos de manosa por 100.000 veces, resultando en afinidad débil, por otro lado bajo tensión se suprime la interacción alostérica y aumenta la afinidad del dominio lectina por los residuos de manosa.

Debido a que la estructura de FimH de *Salmonella* aún no ha sido resuelta los estudios estructurales se realizan a nivel bioinformático como el realizado por Kisiela *et al.* 2011 que en su estudio toman como base la estructura tridimensional de *Escherichia* a pesar que solo comparte el 15% de identidad de secuencia con la *Salmonella*, la investigación concluye que a pesar de la

identidad limitada en la secuencia primaria de ambos FimH, estas dos proteínas comparten una topología de estructura terciaria que permite identificar dos dominios (dominio de pilina y dominio de lectina) con un bolsillo de unión a manosa ubicado en el ápice del dominio de lectina, asimismo sugieren que por analogía FimH de *Salmonella* también tiene regulación alostérica catch bound. Según la revisión realizada por Gupta *et al.* 2014 la estructura 3D de una proteína determina su función biológica por ello si no se cuenta con estructuras resueltas se puede predecir la estructura 3D bioinformáticamente por el método de homología y los resultados serán más confiables si la secuencia tiene una homología $\geq 50\%$. Sin embargo se debe tomar en cuenta que a pesar de los progresos significativos para aumentar la calidad de los modelos a nivel experimental aún hay varios desafíos y deficiencia y a menudo los resultados bioinformáticos representan sólo fracciones de la longitud total de la proteína deseada, dejando preguntas no resueltas.

Mientras no se resuelva la estructura 3D de FimH de *Salmonella* las conclusiones a partir de la estructura de FimH de *Escherichia coli* no son resultados concluyentes, es decir no se puede ubicar con precisión sus epitopes o se puede asegurar que tenga regulación alostérica catch bound.

2.4 Tecnología de ADN recombinante

Tecnología del ADN recombinante es la técnica que permite que el ADN se produzca a través de medios artificiales. El procedimiento se ha utilizado para cambiar el ADN en organismos vivos; y consiste en el aislamiento y amplificación de un gen de interés para clonarlo insertándolo mediante enzimas de restricción en otra molécula de ADN que sirve como vehículo o vector (puede ser plásmido, cosmidos, etc) y que pueden replicarse en células vivas (Tuan R. 1997, Stryjewska *et al.* 2013). La tecnología de ADN recombinante es posible mediante la elaboración de constructos genéticos los cuales dependiendo del diseño del

investigador pueden delecionar un gen, insertar un gen o expresar proteínas recombinantes (Liu, 2013, Beker *et al.* 2016).

2.4.1 Elaboración de constructos genéticos para expresar proteínas recombinantes

Un constructo genético puede elaborarse con la finalidad de expresar solublemente una proteína recombinante, en este caso para aumentar la probabilidades de obtener proteína soluble se debe realizar un análisis *in silico*, previo al diseño del constructo genético, de parámetros como: codones raros, toxicidad, péptido señal, proteínas transmembrana, regiones intrínsecamente desestructuradas, entre otros (Welch *et al.* 2011).

2.4.2 Constructos genéticos para expresar solublemente proteínas de *Salmonella*

Se obtuvo FimH de *Salmonella* Enteritidis y *Salmonella* Typhimurium soluble mediante el diseño de constructos genéticos en el plásmido pTrcHis2b, luego de purificarlas se realizaron estudios de adhesión, demostrando que ambas proteínas se unen fuertemente a la línea celular del carcinoma de colon humano HT-29 y la línea celular de cáncer de vejiga humana Hu 1703He (Kisiela *et al.* 2005, Kisiela *et al.* 2006).

Se obtuvo la subunidad FliC y el sitio antigénico principal de FliC (SEp9) solubles de *Salmonella* enteritidis (SE) realizando constructos genéticos en el plásmido pDEST15, luego de purificarlos compararon su efecto sistémico con SE desflagelada y la bacterina comercial (Layermune SE), se concluyó que la subunidad FliC puede desempeñar un papel importante como una vacuna de subunidad ya que produce reacción inmunológica continua en la infección y

también interviene en la presentación de antígenos (Mizumoto *et al.* 2004, Toyota *et al.* 2009)

Se obtuvieron proteínas pertenecientes a la isla de patogenicidad 2 (SPI- 2) de *Salmonella* Enteritidis solubles elaborando constructos genéticos en el plásmido pQE-30, luego de purificarlos fueron evaluados como vacunas, los resultados evidenciaron que luego del desafío con la cepa virulenta Sal18 los grupos vacunados desarrollaron respuesta humoral significativa, títulos de IgG ($p < 0,0001$), y que estos anticuerpos eran transferidos a la progenie; adicionalmente (Desin *et al.* 2009, Wisner *et al.* 2011)

Se obtuvieron las proteínas invG, prgI, sipC, sipD y sopB presentes en la superficie bacteriana y codificadas por los genes de la isla de patogenicidad 1 (SPI-1) de *S. Enteritidis* solubles mediante la elaboración de constructos genéticos empleando plásmidos pQE-30 o pET-15b, luego de purificar dichas proteínas se evaluó si podían funcionar como vacuna, se determinó que mediante vacunación oral se puede inducir respuestas específicas mediante anticuerpos IgG reduciendo los niveles de *S. Enteritidis* en el hígado, se concluye que SPI-1 podría ser un componente importante en vacunas de subunidades (Desin *et al.* 2011).

III. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Lugar de investigación

La investigación se realizó en el Laboratorio de Biología Estructural Aplicada (LBEA) perteneciente al Departamento de Microbiología del Instituto de Ciencias Biomédicas (ICB) de la Universidad de São Paulo (USP) con coordenadas de 23°33'34"S 46°43'26"O, ubicada en la Av. Professor Lineu Prestes 1374 de la Cidade Universitária, estado de São Paulo, país de Brasil.

3.2 Adquisición de kits, plásmidos y cepa

Las secuencias nucleotídicas correspondientes a FimH fueron amplificadas de una cepa de *Salmonella enterica* serovar Typhimurium, aislada de *Cavia porcellus* "Cuy" por el Laboratorio de Microbiología de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Ricardo Palma (URP). Asimismo, se emplearon los siguientes kits: kit de amplificación de PCR, kit de purificación de gel de agarosa y de producto de PCR, kit de ligación de ADN y kit de aislamiento de plásmido. Se utilizaron los plásmidos pET28a⁺ y pET-DUET como vectores de expresión y co-expresión respectivamente, donados por el laboratorio LBEA de la USP.

3.3 Elaboración *in silico* de constructos genéticos de *fimH*.

Inicialmente se reconoció la secuencia nucleotídica de *fimH* y la secuencia proteica FimH utilizando la base de datos KEGG- Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (disponible en <http://www.genome.jp/kegg/>), a continuación se realizó un análisis *in silico* de la secuencia proteica y considerando los conceptos de Kapp *et*

al. 2000, Scarsi *et al.* 1999 y Yesylevsky *et al.* 2006 se evaluaron los siguientes indicadores: identificación de dominios proteicos (para ello se empleó las bases de datos del NCBI- Conserved domains, Pfam y SMART, disponibles en <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi>, <http://pfam.xfam.org/> y <http://smart.embl-heidelberg.de/>), identificación del péptido señal (para ello se utilizó la herramienta bioinformática SignalP 4.1 disponible en <http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>), identificación de regiones transmembrana (para ello se utilizó la herramienta bioinformática TMHMM Server v. 2.0 disponible en <http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/>), identificación de regiones intrínsecamente desestructuradas (para ello se utilizó la herramienta bioinformática IUPRED disponible en <http://iupred.enzim.hu/>) y análisis de plegamiento de dominios proteicos (para ello se utilizaron las herramientas bioinformáticas SWISS-MODEL y Phyre2 disponibles en <https://swissmodel.expasy.org/> y <http://www.sbg.bio.ic.ac.uk/phyre2>). Luego se determinaron las secuencia nucleotídicas a clonar y finalmente utilizando el programa SnapGene se realizó la clonación *in silico* de las secuencias nucleotídicas de interés en los plásmidos pET28a+ y pET-DUET.

Se elaboraron tres constructos: dos constructos para co-expresar dos proteínas utilizando el plásmido pET-DUET y un constructo para expresar una proteína utilizando el plásmido pET28a⁺. De los constructos: el primer constructo (pFimH_{24-335FL}-DsF) se diseñó para co-expresar toda la proteína FimH (FimH_{24-335FL}) excepto los primeros 24 aminoácidos que corresponden a un péptido transmembrana, y un péptido de 20 aminoácidos (NSSLGEVNIELRGNVVDFTC) perteneciente a la proteína FimF (DsF) que probablemente evite la formación de agregados de FimH; el segundo constructo (pFimH_{187-335PD}-DsF) se diseñó para co-expresar el dominio de pilina FimH (FimH_{187-335PD}) y el péptido de 20 aminoácidos de FimF también para estabilizar la proteína FimH; y el tercer constructo (pFimH_{24-186LD}) se diseñó para expresar el dominio lectina FimH (FimH_{24-186LD}).

3.4 Clonación *in vitro* de las secuencias nucleotídicas de *fimH* en los plásmidos pET28a⁺ y pET-DUET.

Para elaborar el primer constructo (pFimH_{25-335FL}-DsF), se amplificaron las secuencias nucleotídicas de *fimH*_{25-335FL} y *dsF* con los siguientes cebadores: para *fimH*_{25-335FL}; forward 5' AAAGGATCCATGCCGTAATTCAAACGGGAC 3' y reverse 5' AAAAAGCTTTCAATCATAATCGACTCGTAGATAGCC 3', y para *dsF*; forward 5' CCCCATATGAACTCATCTCTGGGCGA 3' y reverse 5' CCCCTCGAGTCAGGTAAAATCCACCACGTTAC 3'; ambas secuencias se clonaron en pET-DUET en dos pasos: en el primer paso, se realizó la digestión de *fimH*_{25-335FL} y pET-DUET con las enzimas de restricción BamHI y HindIII, estos ADN se cuantificaron, se llevaron a una concentración de 15 ng/μl y luego se ligaron empleando una relación (1:6) (plásmido: amplicón) obteniendo el plásmido pFimH_{25-335FL}, este último se transformó en la cepa DH5α de *Escherichia coli* (*E. coli*) y luego se aisló, y en el segundo paso el plásmido pFimH_{25-335FL} y *dsF* fueron digeridos con las enzimas de restricción XhoI y NdeI, se cuantificaron, se llevaron a una concentración de 15 ng/μl y se ligaron empleando una relación (1:6) (plásmido: amplicón) obteniendo el plásmido pFimH_{25-335FL}-DsF. Para elaborar el segundo constructo (pFimH_{187-335PD}-DsF), *dsF* se amplificó usando los cebadores mencionados en el párrafo anterior y *fimH*_{187-335PD} se amplificó utilizando los siguientes cebadores; forward 5' AAAGGATCCAAGCTACAGCGGCAAAGTG 3' y reverse 5' AAAAAGCTTTCAATCATAATCGACTCGTAGATAGCC 3'; luego ambas secuencias se clonaron en pET-DUET en dos pasos como en el primer constructo, usando las enzimas de restricción BamHI y HindIII para obtener el plásmido pFimH_{187-335PD} y XhoI y NdeI para obtener el plásmido pFimH_{187-335PD}-DsF. Para elaborar el tercer constructo (pFimH_{24-186LD}), *fimH*_{24-186LD} se amplificó con los siguientes cebadores: Forward 5' TTTGCTAGCTGCCGTAATTCAAACGGGAC 3' y reverse 5' TTTCTCGAGTCAAATGGTATATACCGGCGTG3', luego el plásmido pET28a⁺ y *fimH*_{24-186LD} fueron digeridos con las enzimas de restricción NheI y XhoI, se cuantificaron, se llevaron a una concentración de 15 ng/μl y se ligaron

empleando una relación (1:6) (plásmido: amplicón). Posteriormente los tres constructos fueron transformados en la cepa DH5 α de *Escherichia coli* (*E.coli*) mediante la técnica de shock térmico, con la finalidad de aumentar la concentración de ADN plasmídico. Para confirmar que las secuencias de interés (*fimH*_{25-335FL}, *fimH*_{187-335PD}, *fimH*_{24-186LD} y *dsF*) fueron clonadas en los plásmidos, se aislaron los 3 constructos de la cepa DH5 α de *E.coli* y se realizaron 3 ensayos: amplificación de las secuencias de interés, corte por enzimas de restricción y secuenciamiento, este último realizado en Instituto de Química (IQ) de la USP.

3.5 Inducción de la expresión de los constructos elaborados en cepas de expresión.

Para la expresión de los tres constructos (pFimH_{25-335FL}-DsF, pFimH_{187-335PD}-DsF, pFimH_{25-186LD}) se utilizaron diferentes células de *E. coli* como: BL21(DE3), TUNER, ARTIC y Rossetta la cuales previamente fueron transformadas por la técnica de shock térmico. Los ensayos de inducción de la expresión se realizaron a diferentes temperaturas; a 37°C en BL21(DE3), a 18°C en TUNER, a 13°C en ARTIC y a 18°C en Rossetta. Los plásmidos fueron inducidos con IPTG a una concentración de 0.1 mM, se realizó 4 horas de expresión sin inducción y 12 horas de expresión con inducción. La expresión de proteínas fue evaluada mediante SDS-PAGE antes y después de la inducción.

3.6 Determinación de la solubilidad de los fragmentos proteicos de FimH.

En primer lugar, se evaluó el punto isoeléctrico teórico correspondientes a las secuencias proteicas de los fragmentos proteicos que se lograron expresar utilizando la herramienta bioinformática ProtParam disponible en <https://web.expasy.org/protparam/> con la finalidad de conocer el pH óptimo de las proteínas y seleccionar un buffer de lisis adecuado. Posteriormente se realizó

nuevamente la inducción, se colectaron las células por centrifugación y se resuspendieron en el buffer de lisis seleccionado, luego se incubó con lisozima (concentración final de 100 mg / ml) y PMSF (1 mM) durante 1 hora sobre hielo, después se lisaron las células por sonicación y las fracciones solubles se separaron de material insoluble por centrifugación a 14000 rpm durante 20 minutos a 4 °C. La solubilidad se evaluó mediante SDS-PAGE de las fracciones solubles e insolubles.

IV. RESULTADOS

4.1 Elaboración *in silico* de constructos genéticos

4.1.1 Reconocimiento de la secuencia nucleotídica de *fimH* y secuencia proteica de FimH.

Debido a que no contamos con la secuencia completa del genoma de *Salmonella enterica* serovar Typhimurium (*S. Typhimurium*) aislado de *Cavia porcellus* "Cuy" se utilizó como referencia la secuencia del genoma bacteriano de *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar *Typhimurium* 14028S para definir la secuencia nucleotídica del gen de interés: *fimH* (STM14_0639); el cual está compuesto por 1008 nt y es el siguiente:

```
atgaaaatatactcagcgctattgctggcggggaccgcgctcttttcacccatcccgcgctggcgacgggtt
tgcgtaattcaaacgggacggcgaccgatatcttttacgacctgtcagatgtttcaccageggcaataat
cagccgggacaggtggtgacgctgccggaaaaatcaggttgggtcggcgtaaacgcgacgtgcccgg
cggggacaacgggtgaattatactaccgaagctatgtatcagaattaccggtacaaagtaccgaaggaaa
tttaaatacctcaagttgaatgactaccttctgggcgcgatgagcatcaccgatagtgctggcgtatfff
atccgccccgtaactatattctcatgggcgtcgactataacgtgtcgcagcaaaagccgttggcgtgcag
gactcaaagctggttttaataaaaagtatacggccttttataataggtgacgatccctgccagacaat
gtttaccgtctatgtgacgacctctaccggcgacgcggtgagcacgccggtatataccattagctacagcg
gcaaagtgggaagtgccgcaaaactgtgaagtgaatgccggacaggtcgtggagtttgattcggcgatata
cggcgcgctggtatttagtcaggcggggggcggttaatcgtccgcaaggcgtcacgccgcaaacgaaaa
ccattgctatcaaatgtaccaacgtcgcggcgagggcctatttatcgatgcggcttgaagccgaaaaggcc
tcagggcagggcgatggtgtccgataatccggatttaggcttgggttgtaatagcaacgggtacgccgctt
acaccaataattgtcagtaaaattccgttcatcttgatgataacgccgcccgtcgcgtaggtattcgcg
cctggccaatcagcgtgacggggattaaccggcggaaggccggttactgcgcgcggtatctacgag
tcgattatgattaa
```

A partir de la secuencia nucleotídica de *fimH* se determinó la secuencia proteica de FimH, el cual está compuesto por 335 aminoácidos (aa):

```
MKIYSALLLAGTALFFTHPALATVCRNSNGTATDIFYDLSDVFTSG
NNQPGQVVTLPEKSGWVGVNATCPAGTTVNYTYRSYVSELPVQS
TEGNFKYLKLN DYLLGAMSITDSVAGVFYPPRNYILMGVDYNVSQ
QKPFQVQDSKLVFKLVIRPFINMVTIPRQTMFTVYVTTSTGDALS
TPVYTISYSGKVEVPQNCEVNAGQVVEFDGDFGASLFSQAGAGN
```

RPQGVTPQTKTIAIKCTNVAAQAYLSMRLEAEKASGQAMVSDNPD
LGFVVANSNGTPLTPNNLSSKIPFHLDDNAAARVGIRAWPISVTGIK
PAEGPFTARGYLRVDYD.

4.1.2 Análisis *in silico* de la secuencia proteica de FimH

Con la finalidad de aumentar la probabilidad de obtener proteínas solubles se realizó un análisis *in silico* de la secuencia proteica de FimH antes de elaborar los constructos genéticos, se evaluaron los siguientes parámetros: identificación de dominios proteicos, identificación del péptido señal, identificación de regiones intrínsecamente desestructuradas y análisis del plegamiento de proteínas, para luego determinar la secuencia o secuencias proteicas de FimH que expresará los constructo.

4.1.2.1 Identificación de los dominios proteicos

Se utilizaron 3 herramientas bioinformáticas online para determinar los dominios de la proteína FimH: la primera fue la página NCBI- National Center for Biotechnology Information Conserved domains (disponible <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi>), en el cual la totalidad de la secuencia proteica (1-355aa) se presentó como un solo dominio denominado FimH (E-value:0e+00) (**Figura N°1A**), usando la segunda herramienta; Pfam- Protein families database (disponible en <http://pfam.xfam.org/>) se identificó el dominio fimbrial protein compuesto por los aminoácidos desde el 187-335aa (E-value:2.3e-19) (**Figura N°1B**), finalmente la tercera herramienta SMART- Simple Modular Architecture Research Tool (disponible en <http://smart.embl-heidelberg.de/>) debido a que cuenta con información de la base de datos Pfam, también identificó el dominio fimbrial protein (187- 335aa) pero con un e-value diferente (E-value:3.2e-22) ya que las páginas no realizan los cálculos de manera idéntica (**Figura N°1C**).

Los resultados indicaban que había 2 posibilidades: la proteína constituye en su totalidad un solo dominio (1-335aa) o la proteína no tiene dominio

reconocido hasta el aminoácido 186 y luego cuenta con el dominio fimbrial protein (187-335aa). Por lo general trabajar con una proteína que tiene varios dominios aumenta el número de posibles secuencias a clonar (una proteína=un dominio=una secuencia a clonar, una proteína=dos dominios=tres secuencias a clonar, la secuencia proteica completa y las 2 secuencias correspondientes a cada dominio), es por ello que si se da el caso de que una proteína tenga una secuencia con dominio no reconocido, se procede a buscar investigaciones sobre; el número de dominios de FimH de otros organismos relacionados, en este caso por ejemplo: *Escherichia coli*, y sobre la funcionalidad de cada dominio. En investigaciones realizadas por Westerlund y Korhonen, 2005, Stahlhut et al. 2009 y Tchesnokova et al. 2011 en *E. coli* se hace referencia a que FimH tiene reconocido 2 dominios (un dominio de lectina y un dominio de pilina), y que el dominio de lectina tiene la función de adhesión a residuos de manosa de la célula huésped, en otras investigaciones realizadas por Grzymajlo et al. 2010 y Grzymajlo et al. 2013 se concluyó que FimH de *Salmonella* tiene propiedades de adhesión, es decir tiene la misma función ejercida por el dominio de lectina de *E. coli*. En base a esta conclusión se procedió a comparar la posición de los dominios de FimH de *E. coli* K-12 MG1655 y *S. Typhimurium* 14028S utilizando la herramienta online Pfam, se observó que ambas compartían el dominio fimbrial protein (también denominado dominio de pilina- PD), en *E. coli* ubicado desde 167-300aa y en *S. Typhimurium* ubicado desde 187-335aa, además *E. coli* tiene otro dominio; dominio mannose binding (también denominado dominio de lectina- LD) en la posición de 24-168aa a diferencia de *S. Typhimurium* que no tiene dominio conocido en la posición 1-186aa y por ello se postula la hipótesis de que en esta posición exista un dominio de lectina (por la posición y función parecida a la de *E. coli*), sin embargo no se sabe desde que número de aminoácido empezaría el dominio (Figura N°2).

4.1.2.2 Identificación del péptido señal.

Se utilizó la herramienta bioinformática online SignalP 4.1 Server-prediction results (disponible en <http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>) para identificar el péptido señal de la proteína FimH de *S. Typhimurium*. Los resultados de la página se muestran en un gráfico que incluye 3 scores (C-score, S-score e Y-score); el C-score es el puntaje del sitio de escisión, es decir es un puntaje cuyo máximo valor representa el punto de separación entre el péptido señal y la proteína madura, en este caso el C-score_{max} es 23 lo que significa que el péptido señal termina en el aminoácido 22 y la proteína madura inicia en el aminoácido 23; el S-score es el puntaje de predicción del péptido señal, es decir puntajes altos indican que el aminoácido es parte del péptido señal y puntajes bajos indican que el aminoácido es parte de la proteína madura, en este caso los 22 primeros aminoácidos tienen los puntajes más altos; y el Y-score es el puntaje combinado del sitio de escisión, es decir es un puntaje que combina el C-score y el S-score y nos muestra de manera más precisa el punto de escisión, esto debido a que el C-score puede dar varios puntajes máximos, aunque en este caso hay solo un C-score_{max}. Analizando los 3 scores se concluye que FimH de *S. Typhimurium* tiene un péptido señal en los primeros 22aa (MKIYSALLLAGTALFFTHPALA) (**Figura N°3**).

4.1.2.3 Identificación de regiones transmembrana.

Se utilizó la herramienta bioinformática online TMHMM Server v. 2.0. Prediction of transmembrane helices in proteins (disponible en <http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/>) para identificar las regiones transmembrana de FimH de *S. Typhimurium*. Los resultados se consolidan en un gráfico que muestra 3 tipos de posicionamiento celular (transmembrana-transmembrane, dentro de célula-inside y fuera de la membrana -outside) para una secuencia de aminoácidos específica, en el caso de FimH se observa que se reconoce como región transmembrana la secuencia 1-24aa (secuencia que incluye el péptido señal, más los siguientes

2 aminoácidos: treonina (T) y valina (V)), además reconoce toda la secuencia 1-335aa como una proteína que se ubica fuera de la membrana, resultado que coincide con el hecho de que FimH es una proteína de la fimbria y por ende se ubica en la parte externa de la membrana (**Figura N°4**).

4.1.2.4 Identificación de regiones intrínsecamente desestructuradas

Se utilizó la herramienta bioinformática online IUPRED- Intrinsically unstructured/disordered proteins (disponible en <http://iupred.enzim.hu/>) opción, desorden largo, para determinar si la proteína tenía regiones intrínsecamente desordenadas, es decir regiones flexibles que carecen de una estructura tridimensional fija y ordenada, información que nos permite tener un panorama de nuevos puntos posibles para dividir la proteína y diseñar más constructos. Los resultados de la proteína FimH de *S. Typhimurium* muestran que no hay regiones con alto grado de desorden (>0.5), por lo tanto no aumenta el número de posibles constructos para la proteína (**Figura N°5**).

4.1.2.5 Análisis de plegamiento de dominios.

La evaluación de plegamiento de dominios se realizó mediante el modelamiento de FimH de *S. Typhimurium*, para ello se utilizaron 2 herramientas bioinformáticas: SWISS-MODEL (disponible en <https://swissmodel.expasy.org/>) y Phyre2- Protein Homology/analogy Recognition Engine V 2.0 (disponible en <http://www.sbg.bio.ic.ac.uk/phyre2/html/page.cgi?id=index>) los cuales construyen modelos 3D de una proteína, en base a homología estructural a partir de una secuencia de aminoácidos. SWISS-MODEL dio como resultado 4 modelos, de los cuales el modelo N°1 fue el que se adecuó mejor, debido a que presentaba mayor identidad (24.19%), mayor cobertura (0.93), mayor GMQE (0.61) y un QMEAN aceptable (>-4.0) (**Figura N°6**). Phyre2 dio como resultado 20 modelos, siendo el modelo N°1 el mejor de todos,

con una confianza del 100%, una cobertura del 93% y una identidad del 24% (**Figura N°7**). Debido a que ambos modelos utilizaron el mismo template (5AFO) correspondiente a la fimbriae de *E. coli*, los modelos pueden ser similares, además en ambos modelos notamos la presencia de una hoja beta donde converge el dominio de lectina con el dominio de pilina, sin embargo a pesar de ello podemos concluir que los dominios de lectina y pilina guardan cierta independencia. Luego de comparar los modelos generados bioinformáticamente de FimH de *S. Typhimurium* con la estructura resuelta de FimH de *E. coli* K-12 MG1655 (3JWN) podemos sacar 2 conclusiones: primero, ambos FimH cuentan con una hoja beta donde convergen sus dos dominios y segundo, al analizar FimH de *E. coli* notamos que su estructura está asociada a una hoja beta de FimG, que a su vez se asocia a otra hoja beta de FimF, a este tipo de ensamblaje se le denomina chaperone usher y se realiza de acuerdo a los genes de su operón *fim* (*fimA*, *fimI*, *fimC*, *fimD*, *fimF*, *fimG* y *fimH*), según la investigación realizada por Sauer *et al.* 2016 la expresión de FimH solo sin el péptido de FimG (DsG) con el cual interacciona para el ensamblaje de la fimbria no es estable y muestra tendencia a agregarse en condiciones fisiológicas. Por otro lado, en el caso de *S. Typhimurium* su operón *fim* (*fimA*, *fimI*, *fimC*, *fimD*, *fimF* y *fimH*) no cuenta con el gen *fimG* por lo consiguiente el ensamblaje se realiza directamente entre FimF y FimH; realizando una inferencia para *S. Typhimurium* de la investigación de Sauer *et al.* 2016 estudiada en *E. coli* concluimos que para favorecer la estabilidad de FimH debemos producirla en interacción con el péptido de FimF (DsF), ya que DsF estabiliza FimH por medio de puentes de hidrogeno producidos entre los 13 primeros aminoácidos de FimF (Ala1, Asp2, Val3, Thr4, Ile5, Thr6, Val7, Asn8, Gly9, Lys10, Val11 y Val12) y las hojas beta 2 y 9 (β_2 y β_9) de FimH, una técnica que nos permite ello es la co-expresión de proteína por medio del plásmido pET-DUET (**Figura N°8**). La co-expresión de FimH con un péptido de FimF utilizando el plásmido de co-expresión pET-DUET requiere del conocimiento de las secuencias proteicas que se van a expresar ya que de acuerdo a ello se establecerán las secuencias nucleotídicas a

clonar. En el caso de FimH la secuencia proteica no debe incluir el péptido señal (1-22a) e incluso es preferible no incluir los 2 aminoácidos siguientes: treonina (T) y valina (V) ya que pertenecen a la región transmembrana, por lo consiguiente la secuencia proteica que contiene sus 2 dominios (Full length- FL) y que será expresada es FimH_{25-335FL}, además de FimH_{25-335FL} el plásmido pET-DUET expresará un péptido de FimF (DsF), para determinar la secuencia proteica correspondiente al péptido se realizó una inferencia de cómo fue calculada la secuencia de DsG en Sauer *et al.* 2016, DsG estuvo compuesta por los 15 aminoácidos (24-38aa) (ADVTTITVNGKVVAKR) después del péptido señal de FimG (1-23aa), de la misma manera calculamos el péptido señal de FimF (1-21aa), sin embargo en lugar de coger los siguientes 15 aminoácidos seleccionamos los siguientes 20 aminoácidos (22-41aa) (NSSLGGEVNIELRGNVVDFTC) con la finalidad de aumentar la probabilidad de secuenciar el péptido (**Figura N°9**).

4.1.3 Determinación de las secuencias nucleotídicas a clonar en los plásmidos en los plásmidos pET-DUET y pET28a⁺.

Debido a que FimH de *S. Typhimurium* tiene un péptido señal en los primeros 22 aminoácidos, que la secuencia 1-24aa es reconocida como región transmembrana, que no cuenta con regiones intrínsecamente desestructuradas, que posiblemente tiene 2 dominios: dominio de lectina (25-186aa) y dominio de pilina (187-335aa), que el plegamiento de los dominios establecen cierta independencia de cada dominio y que para estabilizar FimH (específicamente el dominio pilina) es necesario que se encuentre asociado con un péptido de FimF (DsF) se determinaron cuatro secuencias nucleotídicas diana: *fimH*_{25-335FL} (nucleótidos correspondientes a 25-335aa de FimH), *fimH*_{188-335PD} (nucleótidos correspondientes a 188-335aa de FimH), *fimH*_{25-187LD} (nucleótidos correspondientes a 25-187aa de FimH), y *dsF* (nucleótidos correspondientes a 22-41aa de FimF); las cuales fueron clonadas en los plásmidos pET-DUET o pET28a⁺ con la finalidad de obtener 3 constructos genéticos de FimH: en el primer constructo se clonó

*fimH*_{25-335FL} y *dsF* en el plásmido pET-DUET (pFimH_{25-335FL}-DsF), en el segundo constructo se clonó *fimH*_{188-335PD} y *dsF* en el plásmido pET-DUET (pFimH_{187-335PD}-DsF) y en el tercer constructo se clonó *fimH*_{25-187LD} en el plásmido pET28a⁺ (pFimH_{25-186LD}) (**Figura N°10**). Se empleó el programa SnapGene para seleccionar las enzimas de restricción y diseñar los primers de cada constructo (**Tabla N°2**).

Primer constructo (pFimH_{25-335FL}-DsF)

Plásmido empleado: pET-DUET

Secuencias proteicas de interés:

| Primera secuencia proteica de interés (FimH _{25-335FL}) (312 aa) | Segunda secuencia proteica de interés (DsF) (21 aa) |
|--|---|
| CRNSNGTATDIFYDLSDVFTSGNMQPGQVVTLPEKSGWVGVNATCPAGTTVNYTYRSYVSELPVQSTEGNFKYLKLN DYLLGAMSITDSVAGVFYPRNYILMGVDYNVSQQKPFQVQDSKLVFKLKVIRPFINMVTIPRQTMFTVYVTTSTGDALSTPVYTISSYSGKVEVPQNCENVNAGQVVEFDGDFGASLFSQAGAGNRPQGVTPQTKTIAIKCTNVAAQAYLSMRLEAEKASGQAMVSDNPD LGFVVANSNGTPLTPNNLSSKIPFHLDDNAAARVGIRAWPISVTGIKPAEGPFTARGYLRVDYD* | NSSLGEVNIELRGNVVDFTC* |

Secuencia nucleotídica a clonar:

| Primera secuencia nucleotídica de interés (<i>fimH</i> _{25-335FL}) (955 pb) | Segunda secuencia nucleotídica de interés (<i>dsF</i>) (81 pb) |
|--|--|
| AAAGGATCCatgccgtaattcaaacgggacggcgaccgatattttacgacctgtcagatgtttcaccagcggcaataatcagccgggacaggtggtgacgctgccgaaaaatcaggtgggtcggcgtaaacgacgacgtgccggcggggacaacggtgaattatacctaccgaagctatgtatcagaattaccggtacaagtaccgaaggaaatttaatacctcaagtgaatgactactttctggcgatgagcatcaccgatagtgctgctggcgtattttatccgccgtaactatattctcatggcgctgactataacgtgctgcagcaaaaagcgtttggcggtcaggactcaaacgctggttttaataaaaagtatacggcctttattaataggtgacgatccctgccagacaatgttaccgtctatgtgacgacctaccggcgacgcttgagcacgccggtatatacattagctacagcgcaaaagtgaagtgccgaaaactgtgaagtgaatgccggacaggtcgtggagtttgattcggcgatatacggcgctcgtatttagtcaggcggggggcggtaatcgtccgcaaggcgtcacgccgcaaacgaaaaccattgctatcaaatgtaccaacgctcggcgacggcctatttatcagtcggcttgaa gccgaaaaggcctcaggcaggcagtggtgctccgataatccgatttagctttgtggtgctaatagcaacggtacgccgttacaccaataattgtcagtaaaatccgtttcattgatgataacgccgctcgcgtaggtattcgcgctggccaatcagcgtgacggggattaaaccggcggaaggccgcttactgcgcggctatctacgagtcgattatgatTGAAGCTTTT | CCC CATATG aactcatctctggcggaagtgaatgaactgcgcggtaacgtggtggattttacctgcTGACTCGAGGGG |

En color rojo- sitio de corte de las enzimas de restricción.

En color verde- cola de 3 nucleótidos provenientes de los primers.

En color azul- codón de parada.

Enzimas de restricción seleccionadas: BamHI y HindIII (para FimH_{25-335FL}), NdeI y XhoI (para DsF).

Segundo constructo (pFimH_{187-335PD}-DsF)

Plásmido empleado: pET-DUET

Secuencia proteica de interés:

| Primera secuencia proteica de interés (FimH _{187-335PD}) (149 pb) | Segunda secuencia proteica de interés (DsF) (21 aa) |
|--|---|
| SYSGKVEVPQNCEVNAGQVVEFDGFDIGASLF SQAGAGNRPQGVTPQTKTIAIKCTNVAAQAYL SMRLEAEKASGQAMVSDNPD LGFVVANSNGT PLTPNNLSSKIPFHLDDNAAARV GIRAWPISVT GIKPAEGPFTARGYL RVDYD* | NSSLGEVNIELRGNVVDFTC* |

Secuencia nucleotídica a clonar:

| Primera secuencia nucleotídica de interés (<i>fimH</i> _{187-335PD}) (466 pb) | Segunda secuencia nucleotídica de interés (<i>dsF</i>) (81 pb) |
|--|---|
| AAAGGATCCaagctacagcggcaaaagtggaagtgccgcaaaac tgtgaagtgaatgccggacaggtcgtggagttgattcggcgatcggc gcgtcgttatttagtcaggcggggcgggtaatcgtccgaaggcgtcac gccgaaacgaaaaccattgctatcaaatgtaccaacgtcgcggcgcag gcctattatc gatcggctgaagccgaaaaggcctcagggcaggcgat ggtgtccgataatccgattaggcttgggtgctaatacgaacggtacg ccgcttacaccaataattgtcgagtaaaattcgtttcatcttgatgataac gccgccgctcgcgtaggtattcgcgctggccaatcagcgtgacgggga ttaaacggcgggaagggccgttactgcgcggtatctacgagtcgatt atgatTGAAAGCTTTT | CCCATATGaactcatctctggcggaagtg aatattgaactgcgcggtaacgtgggtggattttacct gcTGACTCGAGGGG |

En color rojo- sitio de corte de las enzimas de restricción.

En color verde- cola de 3 nucleótidos provenientes de los primers.

En color azul- codón de parada.

Enzimas de restricción seleccionadas: BamHI y HindIII (para FimH_{187-335PD}), NdeI y XhoI (para DsF).

Tercer constructo (pFimH_{25-186LD})

Plásmido empleado: pET28a⁺

Secuencia proteica de interés:

| Única secuencia proteica de interés FimH _{25-186LD} (164 aa) |
|---|
| CRNSNGTATDIFYDLSDVFTSGNQPQGVVTLPEKSGWVGVNAT CPAGTTVNYTYRSYVSELPVQSTEGNFKYLKLN DYLLGAMSITDS VAGVFYPPRNYILMGVDYNVSQQKPFQVQDSKLVFKLVIRPFIN MVTIPRQTMFTVYVTTSTGDALSTPVYTI* |

Secuencia nucleotídica a clonar:

Única secuencia nucleotídica de interés *fimH*_{25-186LD} (510 pb)

```
TTTGCTAGCtgccgtaattcaaacgggacggcgaccgatatctttacgacctgtcagatgtttca  
ccagcggcaataatcagccgggacaggtggtgacgctgccggaaaaatcagttgggtcggcgtaaa  
cgcgacgtgcccggcggggacaacggtgaattatacctaccgaagctatgtatcagaattaccggtaca  
aagtaccgaaggaaatttaaatacctcaagttgaatgactaccttctgggcgcgatgagcatcaccgata  
gtgtcgctggcgatatttatccgccccgtaactatattctcatgggctgcactataacgtgtcgcagcaaa  
agccgtttggcgtgcaggactcaaagctggttttaaattaaagtgtacggcctttattaatatggtgac  
gatccctgccagacaatgttaccgtctatgtgacgacctaccggcgacgcgttgagcacccggta  
tataccattTGACTCGAGAAA
```

En color rojo- sitio de corte de las enzimas de restricción.

En color verde- cola de 3 nucleótidos provenientes de los primers.

En color azul- codón de parada.

Enzimas de restricción seleccionadas: NheI y XhoI.

4.1.4 Clonación *in silico* de las secuencias nucleotídicas de interés de *fimH* en los plásmidos pET28a⁺ y pET-DUET.

Las clonaciones *in silico* se realizaron en el programa SnapGene, donde las secuencias de interés fueron ligadas a los plásmidos (pET-DUET o pET28a⁺) de tal manera que los fragmentos proteicos de FimH se unan a una cola de histidina (H) (6 aa de H) que luego faciliten su purificación (Figura N°11).

4.2 Clonación *in vitro* de las secuencias nucleotídicas de interés de *fimH* en los plásmidos pET28a⁺ y pET-DUET.

4.2.1 Amplificación de las secuencias nucleotídicas de interés del genoma de *S. Typhimurium*

Se obtuvieron los amplicones de interés *fimH*_{25-335FL} (955 pb), *fimH*_{187-335PD} (466 pb), *fimH*_{25-186LD} (510 pb) y *dsF* (81 pb), las bandas fueron identificadas en una electroforesis horizontal en gel de agarosa (**Figura N°12**).

4.2.2 Confirmación de ligación de las secuencias nucleotídicas de interés en los plásmidos pET-DUET o pET28a⁺

Luego de los procesos de cuantificación del ADN, digestión de las secuencias y su posterior ligación en los plásmidos pET-DUET o pET28a⁺ se verificó si los plásmidos construidos eran los que se esperaban mediante 3 ensayos: amplificación de las secuencias de interés, corte con enzimas de restricción y secuenciamiento.

4.2.2.1 Amplificación de las secuencias nucleotídicas de *fimH*

Para el primer constructo (pFimH_{25-335FL}-DsF) se realizó un PCR multiplex y se amplificaron las 2 secuencias de interés: *fimH*_{25-335FL} (955 pb) y *dsF* (81 pb). Para el segundo constructo (pFimH_{187-335PD}-DsF) también se realizó un PCR multiplex y se amplificaron las 2 secuencias de interés: *fimH*_{187-335PD} (466 pb) y *dsF* (81 pb). Finalmente para el tercer constructo (pFimH_{25-186LD}) se realizó un PCR simple y se amplificó la secuencia de interés correspondiente a *fimH*_{25-186LD} (510 pb). Los tamaños fueron constatados mediante electroforesis horizontal en gel de agarosa (**Figura N°13**).

4.2.2.2 Corte con enzimas de restricción

El primer (pFimH_{25-335FL}-DsF) y segundo constructo (pFimH_{187-335PD}-DsF) fueron digeridos con las enzimas de restricción: BamHI, HindIII, NdeI y

XhoI, generando las secuencias de interés de *fimH*_{25-335FL} (937 pb) y *dsF* (63 pb) a partir del plásmido pFimH_{25-335FL}-DsF, y las secuencias de interés de *fimH*_{187-335PD} (448 pb) y *dsF* (63 pb) a partir del plásmido pFimH_{187-335PD}-DsF; el tercer constructo (pFimH_{25-186LD}) fue digerido con las enzimas de restricción: NheI y XhoI y se generó la secuencia de interés de *fimH*_{25-186LD} (492pb) (**Figura N°14**).

4.2.2.3 Secuenciamiento

Los resultados de los secuenciamientos realizados en el IQ de la USP fueron los siguientes: en el primer constructo (pFimH_{25-335FL}-DsF) se logró secuenciar 906 pb de los 937 pb del gen *fimH*_{25-335FL} y se confirmó la identidad de los 906 pb, en el segundo constructo (pFimH_{187-335PD}-DsF) se confirmó la identidad de los 447 pb del gen *fimH*_{187-335PD} y en el tercer constructo se logró secuenciar los 492 pb del gen *fimH*_{24-186LD} pero se confirmó la identidad de 491 pb, es decir había una mutación puntual (G348A) sin embargo se trataba de una mutación silenciosa ya que ambos codones: AAG_{WT} y AAA codifican para lisina(K) (**Gráfico N°3 y 4**). Finalmente, el gen *dsF* (63 pb) no se logró secuenciar debido a la baja calidad de los picos (**Gráfico N°5**).

4.3 Expresión de los constructos elaborados en diferentes cepas de expresión.

Se logró expresar las tres proteínas recombinantes (FimH_{25-335FL}, FimH_{187-335PD} y FimH_{25-186LD}) en las cepas de expresión BL21(DE3), ROSETTA, TUNER y ARTIC de *E.coli*, sin embargo los niveles de expresión fueron diferentes dependiendo de la proteína expresada y la cepa empleada. La proteína FimH_{25-335FL} tuvo mayor expresión en las cepas BL21(DE3) y TUNER (**Figura N°15**), la proteína FimH_{187-335PD} tuvo mayor expresión en la cepa TUNER (**Figura N°16**) y la proteína FimH_{25-186LD} tuvo mayor expresión en las cepas ROSETTA y TUNER (**Figura N°17**).

4.4 Determinación de la solubilidad de la proteína o fragmentos proteicos de FimH

Debido a que se logró expresar las tres proteínas de interés, se realizó una evaluación su punto isoeléctrico (FimH_{25-335FL} pI=6.37, FimH_{187-335PD} pI=6.13 y FimH_{25-186LD} pI=8.51), se determinó que un pH óptimo para los tres constructos es 7.2 y se seleccionó el siguiente buffer (TRIS-HCl pH=7.2, glicerol 5%, 100 Mm NaCl y 20 Imidazol) para realizar los ensayos de solubilidad.

Los ensayos de solubilidad realizados en las cepas BL21(DE3), ROSETTA, TUNER y ARTIC de *E.coli* mostraron que la proteína FimH_{25-335FL} no es soluble en ninguna de las cepas (**Figura N°18**), la proteína FimH_{187-335PD} tampoco es soluble en ninguna de las cepas (**Figura N°19**) y la proteína FimH_{25-186LD} es soluble en la cepa BL21(DE3) (**Figura N°20**).

V. DISCUSIÓN

5.1 Análisis *in silico* de FimH de *S. Typhimurium*

El análisis *in silico* realizado en este trabajo comparó las secuencia proteicas de FimH de *S. Typhimurium* y *E. coli* y se identificó que ambas poseen el dominio de pilina en común, además se comparó la funcionalidad de ambas proteínas y en base al análisis de las investigaciones de Westerlund y Korhonen, 2005, Stahlhut *et al.* 2009, Tchesnokova *et al.* 2011, Grzymajlo *et al.* 2010, Grzymajlo *et al.* 2013 y Yue *et al.* 2015 se concluyó que ambas proteínas son adhesinas, función que es ejercida por el dominio de lectina, el cual no es reconocido en *S. Typhimurium*, por ello el presente trabajo sugiere que FimH de *S. Typhimurium* tiene dos dominios: el dominio de lectina (en posición de 25-186 aa) y el dominio de pilina (en posición de 187-335 aa), corroborando el trabajo de Kisiela *et al.* 2011 donde realizaron modelamientos *in silico* de la estructura tridimensional de FimH de *S. Typhimurium* en base a la estructura resuelta por cristalografía de FimH de *Escherichia coli*, tomando en consideración que todas las proteínas de FimH almacenadas en el PDB pertenecen a *E. coli*, y además que las secuencias de FimH de *S. Typhimurium* y *E. coli* solo comparten un 15% de identidad y también concluyeron que al igual que *E. coli*, FimH de *S. Typhimurium* también tiene dos dominios: el dominio de lectina- FimH_{LD} (dominio de unión a manosa ubicado en el ápice) y el dominio de pilina- FimH_{PD} (dominio de unión a las otras proteínas de la fimbria),

5.2 Elaboración de constructos genéticos para expresar solublemente FimH

En el presente trabajo se logró expresar solublemente FimH_{LD} al igual que en la investigación de Vetsch *et al.* 2002, sin embargo, se emplearon metodologías diferentes ya que en Vetsch *et al.* 2002 elaboraron un constructo genético para expresar periplasmáticamente FimH de *E. coli* empleando el plásmido pDsbA3 y en este trabajo se elaboró un constructo genético para expresar citoplasmáticamente FimH_{LD} de *S. Typhimurium* utilizando el plásmido pET-28a⁺.

En la investigación de Sauer *et al.* 2016 sobre FimH de *E. coli* se concluyó que para aumentar los niveles de expresión de la proteína recombinante FimH_{FL} (FimH con sus dos dominios) es necesario que se elabore un constructo genético en el cual se clone la secuencia nucleotídica de *fimH* cambiando los 6 codones raros que tiene; además para evitar que FimH_{FL} se aglomere con otras proteínas fimbriales fue necesario que el constructo genético co-exprese FimH_{FL} en asociación con un péptido de 20 aa correspondiente al N-terminal de FimG (proteína que en *E. coli* se une a FimH en el proceso de ensamblaje de la fimbria), por ello para producir FimH_{FL} estable utilizaron la siguiente metodología: realizaron 6 mutaciones silenciosas, co-expresaron FimH_{FL} con la chaperona FimC, luego este complejo (FimH_{FL}:FimC) fue incubado con el péptido sintético de FimG (DsG) y por competencia de afinidad se obtuvo el complejo FimH_{FL}:DsG, es decir FimH_{FL} estable. En este trabajo realizado en *S. Typhimurium*, se elaboró un constructo genético donde la secuencia nucleotídica de *fimH* no fue optimizada para la expresión de FimH_{FL} por medio de mutaciones puntuales de los codones raros pero si se intentó producir FimH_{FL} estable, es decir en asociación a un péptido de 25 aa correspondiente al N-terminal de FimF (proteína que en *S. Typhimurium* se une a FimH en el proceso de ensamblaje de la fimbria), para ello se empleó una metodología diferente; se utilizó el plásmido pET-DUET para co-expresar FimH_{FL} con el péptido de FimF (DsF). Como resultado de las diferentes metodologías

utilizadas para la expresión, el presente trabajo no logró obtener FimH_{FL} soluble a diferencia de Sauer *et al.* 2016 que logró expresar solublemente FimH_{FL}.

El constructo genético elaborado en este trabajo mediante la clonación de *fimH*_{25-335FL} en el plásmido pET-DUET no logró expresar solublemente FimH_{25-335FL} (FimH sin péptido señal) de *S. Typhimurium* aislada de *Cavia porcellus*, en contraposición de la investigación de Kisiela *et al.* 2005 y Kisiela *et al.* 2006 donde se elaboró un constructo genético que contenía el gen *fimH*_{1-335FL} en el plásmido pTrcHis2b y se obtuvo FimH_{1-335FL} (FimH con péptido señal) soluble de *S. Typhimurium* aislada de gallinas ponedoras. La diferencia de resultados puede estar relacionado con el empleo de distintos vectores de expresión o la diferencia de aminoácidos entre las secuencias proteicas de FimH expresadas, Kisiela *et al.* 2005 y Kisiela *et al.* 2006 producen FimH con alanina en posición 61 (A61) y serina en posición 118 (S118) y en nuestro trabajo se expresa FimH con glicina en posición 61 (G61) y fenilalanina en posición 118 (F118), estas diferencias podrían influir en la solubilidad de la proteína.

5.3 Elaboración de constructos genéticos para expresar solublemente proteínas de *Salmonella*

En el presente trabajo también se elaboró un constructo genético de expresión citoplasmática empleando el plásmido pET-28a⁺ y se logró expresar solublemente FimH_{LD} (dominio de lectina de FimH), de la misma manera en diferentes investigaciones desarrolladas por Mizumoto *et al.* 2004, Desin *et al.* 2009, Wisner *et al.* 2011 y Desin *et al.* 2011 se lograron expresar solublemente algunas proteínas de *Salmonella* relacionadas con su virulencia empleando diferentes plásmidos de expresión citoplasmática. Mizumoto *et al.* 2004 elaboró constructos genéticos en el plásmido pDEST15 para expresar solublemente la subunidad FliC y el sitio antigénico principal de FliC (SEp9) de *Salmonella enteritidis* (SE). Desin *et al.* 2009 y Wisner *et al.* 2011 elaboraron constructos genéticos en el plásmido pQE-30 para expresar solublemente proteínas pertenecientes a la isla de patogenicidad 2

(SPI- 2) de *Salmonella* Enteritidis. Desin *et al.* 2011 elaboraron constructos genéticos empleando plásmidos pQE-30 o pET-15b para expresar solublemente las proteínas invG, prgI, sipC, sipD y sopB presentes en la superficie bacteriana y codificadas por los genes de la isla de patogenicidad 1 (SPI-1) de *S. Enteritidis*.

VI. CONCLUSIONES

En análisis *in silico* de FimH de *S. Typhimurium* concluyó que esta proteína presenta un péptido señal en los primeros 22aa, presenta una región transmembrana en los primeros 24aa, no cuenta con regiones intrínsecamente desestructuradas, posiblemente tiene 2 dominios como en *E. coli*: dominio de lectina (en posición de 25-186aa) y dominio de pilina (en posición de 187-335aa) y que el plegamiento de sus dominios tiene cierta independencia.

Se logró elaborar tres constructos genéticos *in vitro*: dos de co-expresión (pFimH_{25-335FL}-DsF y pFimH_{187-335PD}-DsF) y uno de expresión (pFimH_{25-186LD}); pFimH_{25-335FL}-DsF para expresar los dos dominios de FimH con DsF, pFimH_{187-335PD}-DsF para expresar el dominio de pilina con DsF, y pFimH_{25-186LD} para expresar el dominio de lectina.

Se logró secuenciar los amplicones *fimH*_{25-186LD}, *fimH*_{187-335PD} y *fimH*_{25-335FL} de los constructos elaborados. En el constructo pFimH_{25-186LD} la secuencia nucleotídica de *fimH*_{25-186LD} presentó una mutación puntual G348A sin embargo se trataba de una mutación silenciosa por lo tanto no cambiaba la expresión de la proteína, en el constructo pFimH_{187-335PD}-DsF la secuencia nucleotídica de *fimH*_{187-335PD} fue introducida con éxito sin ninguna mutación, y en el constructo pFimH_{25-335FL}-DsF, *fimH*_{25-335FL} fue secuenciada parcialmente (906 pb de 937 pb), los primeros 906 pb no presentaron mutación; sin embargo en los constructos pFimH_{187-335PD}-DsF y pFimH_{25-335FL}-DsF no fue posible secuenciar *dsF*, péptido que de acuerdo al análisis *in silico* disminuye las posibilidades de agregación de FimH.

Se logró expresar tres fragmentos proteicos de FimH: FimH_{25-335FL}, FimH_{187-335PD} y FimH_{25-186LD}, en las cepas BL21(DE3), TUNER, ARTIC y Rosetta.

Se logró obtener la proteína FimH_{25-186LD} soluble cuando se realizó la inducción de la expresión a una temperatura de 37°C y empleando la cepa BL21(DE3) transformada con pFimH_{25-186LD}.

VII. RECOMENDACIONES

1. Elaborar constructos genéticos en diferentes plásmidos de expresión para obtener FimH_{FL} soluble.
2. Buscar protocolos de purificación y estandarizarlos para las proteínas: FimH_{LD} y FimH_{FL}.
3. Igualmente se recomienda realizar ensayos de cristalización de FimH de *S. Typhimurium* para resolver su estructura tridimensional (ninguna estructura de FimH de *S. Typhimurium* ha sido almacenada hasta el momento en el PDB).
4. También se recomienda realizar ensayos biofísicos, como: ITC- Isothermal Titration Calorimetric y Fuerza de Tracción, para determinar si FimH de *S. Typhimurium* al igual que *E.coli* tiene enlace tipo catch-bound con el ligando.

VIII. REFERENCIAS CITADAS

1. Agudelo W. Patarroyo M. 2010. Quantum Chemical Analysis of MHC-Peptide Interactions for Vaccine Design. *Mini-Reviews in Medicinal Chemistry*. 10 (8): 746-758.
2. Arnedo A. Bellido J. Romeu A. Meseguer N. 2017. Detection of foodborne *Salmonella* Typhimurium outbreaks. *Enfermedades infecciosas y microbiología clínica*. 35(7):470-471.
3. Beker M. Boari P. Burachik M. Cuadrado V. Junco M. Lede S. Lema M. Lewi D. Maggi A. Meoniz I. Noe G. Roca C. Robredo C. Rubinstein C. Vicien C. Whelan A. 2016. Development of a construct-based risk assessment framework for genetic engineered crops. *Transgenic Res* 25:597–607.
4. Busch A. Waksman G. 2012. Chaperone–usher pathways: diversity and pilus assembly mechanism. *Phil. Trans. R. Soc. B* (2012) 367, 1112–1122.
5. Busch A. Phan G. Waksman G. 2015 Molecular mechanism of bacterial type 1 and P pili assembly. *Phil. Trans. R. Soc. A*.
6. Brenner F. Villar R. Angulo F. Tauxe R. Swaminathan B. 2000. *Salmonella* Nomenclature. *J. Clin. Microbiol.* 38(7):2465-2467.
7. Centers for Disease Control and Prevention. 2009. Actualización de las investigaciones: Brotes infecciosos causados por *Salmonella* Typhimurium, 2008–2009. Disponible en: <http://www.cdc.gov/salmonella/es/typhimurium/>.
8. Chan P. Curtis R. Warwicker J. 2013. Soluble expression of proteins correlates with a lack of positively-charged surface. *Scientific Reports*. 3 (3333).
9. Desin T. Köster W. Potter A. 2013. *Salmonella* vaccines in poultry: past present and future. *Vaccines*. 12(1): 87–96.
10. Desin T. Lam P. Koch B. Mickael C. Berberov E. Wisner A. Townsend H. Potter A. Köster W. 2009. *Salmonella enterica* serovar Enteritidis pathogenicity island 1 is not essential for but facilitates rapid systemic spread in chickens. *Infect. Immun.* 77: 2866–2875.
11. Desin T. Wisner A. Lam P. Berberov E. Mickael C. Potter A. Köster W. 2011. Evaluation of *Salmonella enterica* serovar Enteritidis pathogenicity island-1

- proteins as vaccine candidates against *S. Enteritidis* challenge in chickens. *Veterinary Microbiology* 148. 298–307.
12. Doyle, M. Buchanan R. 2013. *Food Microbiology. Fundamentals and Frontiers*. 4th Edition. American Society for Microbiology. Washington. USA.
 13. Dufresne K. Daigle F. 2017. *Salmonella* Fimbriae: What is the Clue to Their Hairdo?. INTECH.
 14. Dwyer B. Newton K. Kisiela D. Sokurenko E. Clegg S. 2011. Single nucleotide polymorphisms of fimH associated with adherence and biofilm formation by serovars of *Salmonella enterica*. *Microbiology*. 157: 3162–3171.
 15. European Food Safety Authority (EFSA) y European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC). 2015. The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2014.
 16. Figueroa I. Verdugo A. 2005. Mecanismos moleculares de patogenicidad de *Salmonella* sp. *Rev Latinoam Microbiol*. 47 (1-2): 25-42.
 17. Fronzes R. Remaut H. Waksman G. 2008. Architectures and biogenesis of non-flagellar protein appendages in Gram-negative bacteria. *The EMBO Journal*. 27, 2271–2280.
 18. Guo A. Cao S. Tu L. Chen P. Zhang C. Jia A. Yang W. Liu Z. Chen H. Schifferli, D. 2009. FimH alleles direct preferential binding of *Salmonella* to distinct mammalian cells or to avian cells. *Microbiology*. 155: 1623–1633.
 19. Grzymajlo K. Kuzminska M. Jaworski J. Dobryczycki P. Ugorski M. 2010. The high-adhesive properties of the FimH adhesin of *Salmonella enterica* serovar Enteritidis are determined by a single F118S substitution. *Microbiology*. (6): 1738-48.
 20. Grzymajlo K. Ugorski M. Kolenda R. Kędzierska A. Kuźmińska M. Wieliczko A. 2013. FimH adhesin from host unrestricted *Salmonella* Enteritidis binds to different glycoprotein ligands expressed by enterocytes from sheep, pig and cattle than FimH adhesins from host restricted *Salmonella* Abortus-ovis, *Salmonella* Choleraesuis and *Salmonella* Dublin. 166 (3–4):550-557.
 21. Gupta C. Akhtar S. Bajpai P. 2014. *In silico* Protein modeling: possibilities and limitations. *EXCLI Journal*. 13: 513-515.

22. Kapp K. Schrempf S. Lemberg M. Dobberstein B. 2000. Post-Targeting Functions of Signal Peptides. In: Madame Curie Bioscience Database [Internet]. Austin (TX): Landes Bioscience; 2000-2013. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK6322/>.
23. Kramer R. Shende V. Motl N. Pace C. Scholtz J. 2012. Toward a Molecular Understanding of Protein Solubility: Increased Negative Surface Charge Correlates with Increased Solubility. *Biophysical Journal*. 102(8):1907-1915.
24. Kisiela D. Kramer J. Tchesnokova V. Aprikian P. Yarov-Yarovoy V. Clegg S. Sokurenko E. 2011. Allosteric Catch Bond Properties of the FimH Adhesin from *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium. *The Journal of Biological Chemistry*. 286 (44): 38136–38147.
25. Kisiela D. Laskowska A. Sapeta A. Kuczkowski M. Ugorski M. Functional characterization of the FimH adhesion from *Salmonella enterica* serovar Enteritidis. *Microbiology*. 2006. 152, 1337–1346.
26. Kisiela D. Sapeta A. Kuczkowski M. Stefaniak T. Wieliczko A. Ugorski M. 2005. Characterization of FimH adhesins expressed by *Salmonella enterica* serovar *Gallinarum* biovars *Gallinarum* and *Pullorum*: reconstitution of mannose-binding properties by single amino acid substitution. *Infect Immun*. 73(9):6187-90.
27. Michael R. 2011. New tools in membrane protein determination. *F1000 Biology Reports*. 3:8.
28. Mizumoto N. Toyota Y. Sasai K. Tania H. Ekawa T. Ohta H. Baba E. 2004. Detection of specific antibodies against deflagellated *Salmonella* Enteritidis and *S. Enteritidis* FliC-specific 9 kDa polypeptide. 99(2):113-120.
29. Liu C. 2013. Strategies for Designing Transgenic DNA Constructs. *Methods in molecular biology*. 1027:10.
30. Olbertz J. Lucius R. Hartmann S. Schneider E. WielerHost L. 2015. Factors and compartments accessed by *Salmonella Typhimurium* for intracellular growth and survival. *Lebenswissenschaftlichen Fakultät der Humboldt-Universität*.
31. Patarroyo ME, Bermúdez A, Alba M, Vanegas M, Moreno A, Poloche L, Patarroyo MA. 2015. IMPIPS: The Immune Protection-Inducing Protein Structure Concept in the Search for Steric- Electron and Topochemical

Principles for Complete Fully-Protective Chemically Synthesised Vaccine. Development. PLoS ONE 10(4): e0123249. 1-32.

32. Sauer M. Jakob R. Eras J. Baday S. Eris D. Navarra G. Berne`che S. Ernst B. Maier T. Glockshuber R. 2016. Catch-bond mechanism of the bacterial adhesin FimH. Rev. Nature communications. 7:10738.
33. Singh V. 2013. Salmonella Serovars and Their Host Specificity. Journal of Veterinary Science y Animal Husbandry. 1(3).
34. Song J. 2009. Insight into “insoluble proteins” with pure wáter. FEBS Letters. 583 (6): 953-959.
35. Scarsi M. Majeux N. Caflisch A. 1999. Hydrophobicity at the Surface of Proteins. PROTEINS: Structure, Function, and Genetics 37:565–575.
36. Stahlhut S. Tchesnokova V. Struve C. Weissman S. Chattopadhyay S. Yakovenko O. Aprikian P. Sokurenko E. Krogfelt K. 2009. Comparative Structure-Function Analysis of Mannose-Specific FimH Adhesins from *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli*. J. Bacteriol 191(21):6592-6601.
37. Stryjewska A. Kiepura K. Librowski T. Lochyński S. 2013. Biotechnology and genetic engineering in the new drug development. Part I. DNA technology and recombinant proteins. Pharmacological Reports. 65: 1075- 1085.
38. Thanassi D. Bliska J. Christie P. 2012. Surface organelles assembled by secretion systems of Gram-negative bacteria: diversity in structure and function. Federation of European Microbiological Societies. FEMS Microbiol Rev 36 (2012) 1046–1082.
39. Tchesnokova V. Aprikian P. Kisiela D. Gowey S. Korotkova N. Thomas W. Sokurenko E. 2011. Type 1 Fimbrial Adhesin FimH Elicits an Immune Response That Enhances Cell Adhesion of *Escherichia coli*. Infect Immun. 79(10): 3895–3904.
40. Toyota Y. Inoue M. Ekawa T. Ohta H. Igimi S. Baba E. 2009. Importance of the major Fli C antigenic site of *Salmonella enteritidis* as a subunit vaccine antigen. Vaccine 26. 4135–4137.
41. Tuan R. 1997. Recombinant Gene Expression Protocols. Humana Press-Totowa, New Jersey.

42. Vetsch M. Sebbel P. Glockshuber R. 2002. Chaperone-independent Folding of Type 1 Pilus Domains. 322(4):827-840
43. Welch M. Villalobos A. Gustafsson C. Minshull J. 2011. Designing Genes for Successful Protein Expression. *Methods in Enzymology*. 498: 43-66.
44. Westerlund B. Korhonen T. 2005. Molecular structure of adhesin domains in *Escherichia coli* fimbriae. *Int J Med Microbiol*. 295(6-7):479-86.
45. Wisner A. Desin T. Lam P. Berberov E. Mickael C. Townsend H. Potter A. Köster W. 2011. Immunization of chickens with *Salmonella enterica* subspecies enterica serovar Enteritidis pathogenicity island-2 proteins. *Veterinary Microbiology* 153: 274–284.
46. World Health Organization. 1998. Salmonellosis control: the role of animal and product hygiene. Recommendations for research. WHO Tech Rep Ser. 774: 65.
47. World Health Organisation. 2007. *Salmonella* control at the source. International Food Safety Authorities Network (INFOSAN) 03 (2007), 1–4.
48. World Health Organization Food and Agriculture Organization of the United Nations. 2002. Risk assessments of Salmonella in eggs and broiler chickens. Pag: 26.
49. Yesylevskyy S. Kharkyanen. Demchenko P. 2006. Dynamic Protein Domains: Identification, Interdependence, and Stability. *Biophysical Journal*, 91(2), 670–685.
50. Yue M. Han X. De Masi L. Zhu L. Ma X. Zhang J. Wu R. Schmieder R. Kaushik R. Fraser G. Zhao S. McDermott P. Weill F. Mainil J. Arze C. Fricke F. Edwards R. Brisson D. Zhang N. Rankin S. Schifferli D. 2015. Allelic variation contributes to bacterial host specificity. *Nature Communications*. 6(8754).
51. Yue M. Schifferli D. 2014. Allelic variation in *Salmonella*: an underappreciated driver of adaptation and virulence. *Frontiers in Microbiology. Evolutionary and Genomic Microbiology*. 4(419).
52. Zeiner S. Dwyer B. Clegg S. 2012. FimA, FimF, and FimH Are Necessary for Assembly of Type 1 Fimbriae on *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium. *Infection and Immunity*. 80: 9 3289–3296.

IX. ANEXOS

9.1. FIGURAS

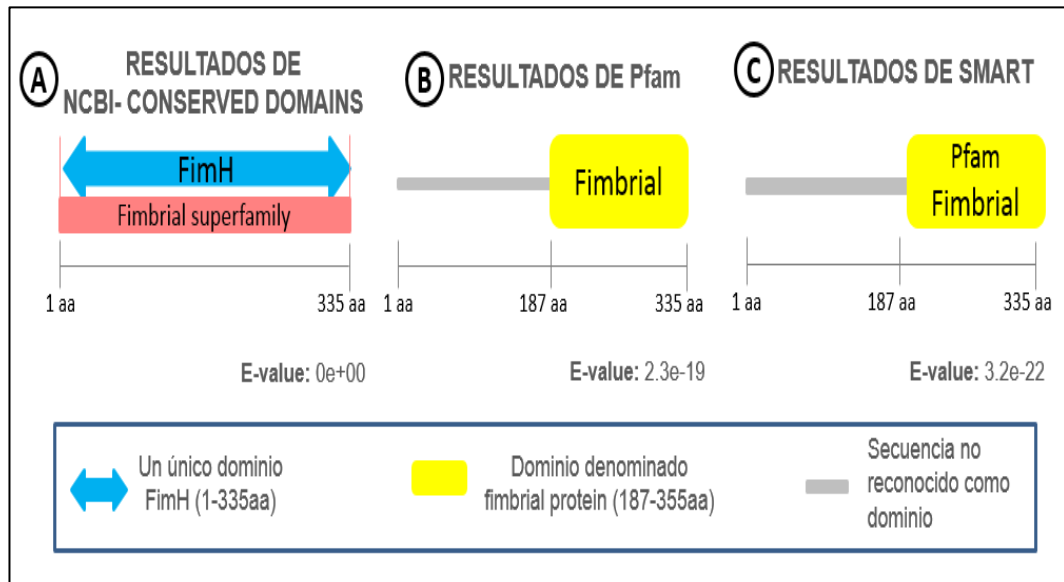


Figura N°1. Identificación de dominios de la proteína FimH de *S. Typhimurium*.

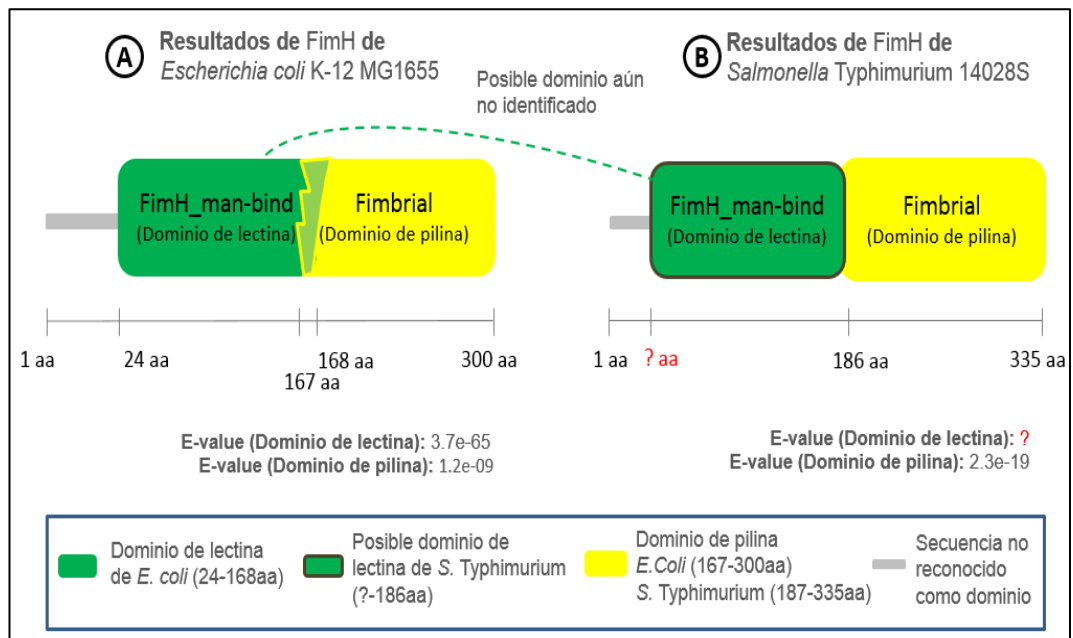


Figura N°2. Comparación de los dominios de FimH de *E. coli* y *S. Typhimurium*.

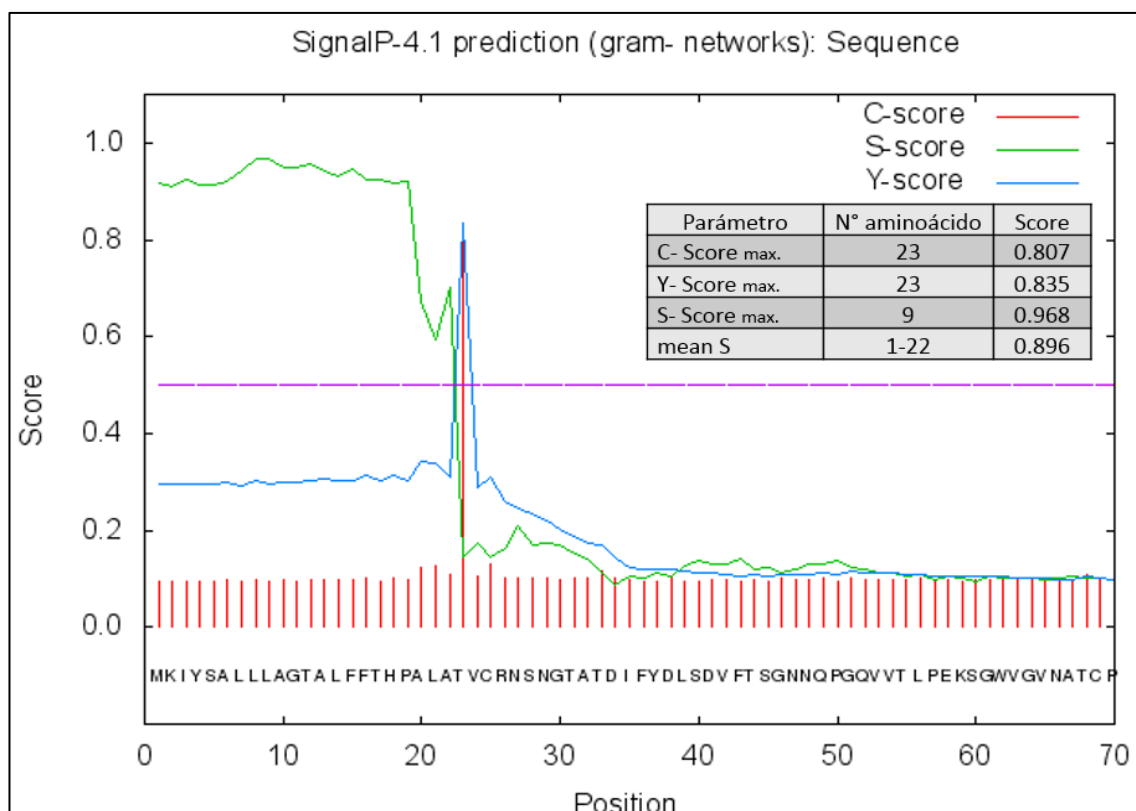


Figura N°3. Identificación del péptido señal de FimH de *S. Typhimurium*.

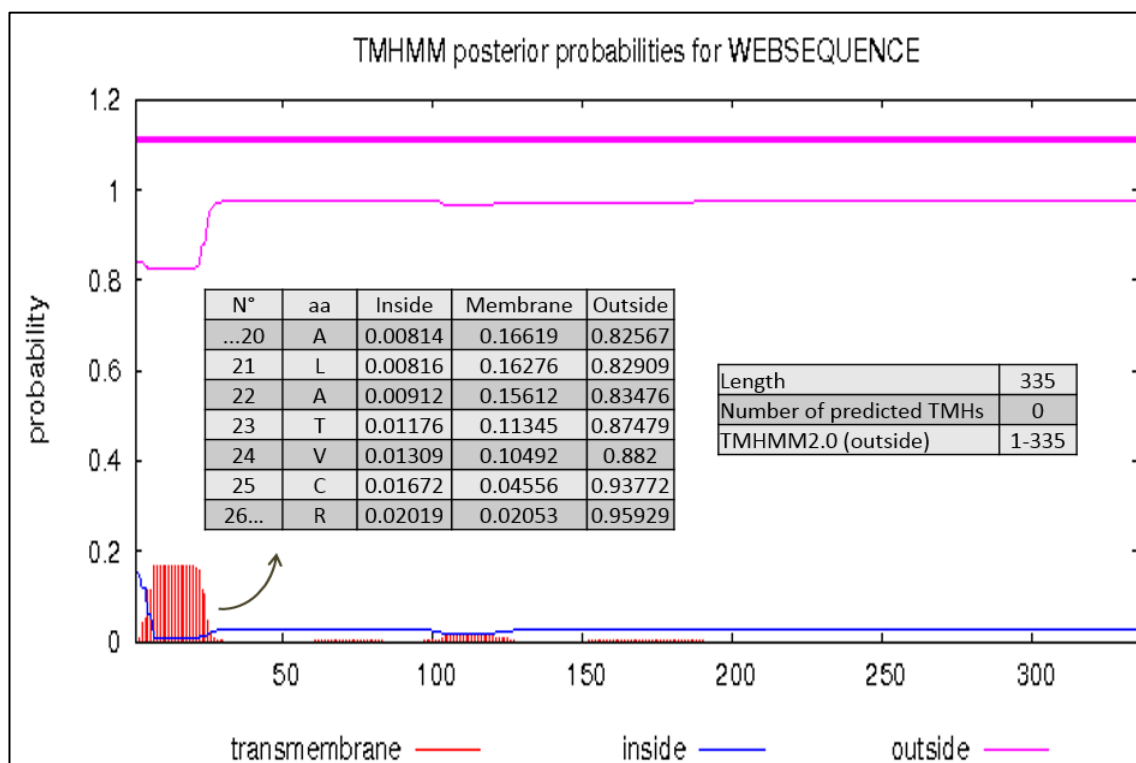


Figura N°4. Identificación de regiones transmembrana de FimH de *S. Typhimurium*.



Figura N°5. Identificación de regiones intrínsecamente desordenadas de FimH de *S. Typhimurium*.

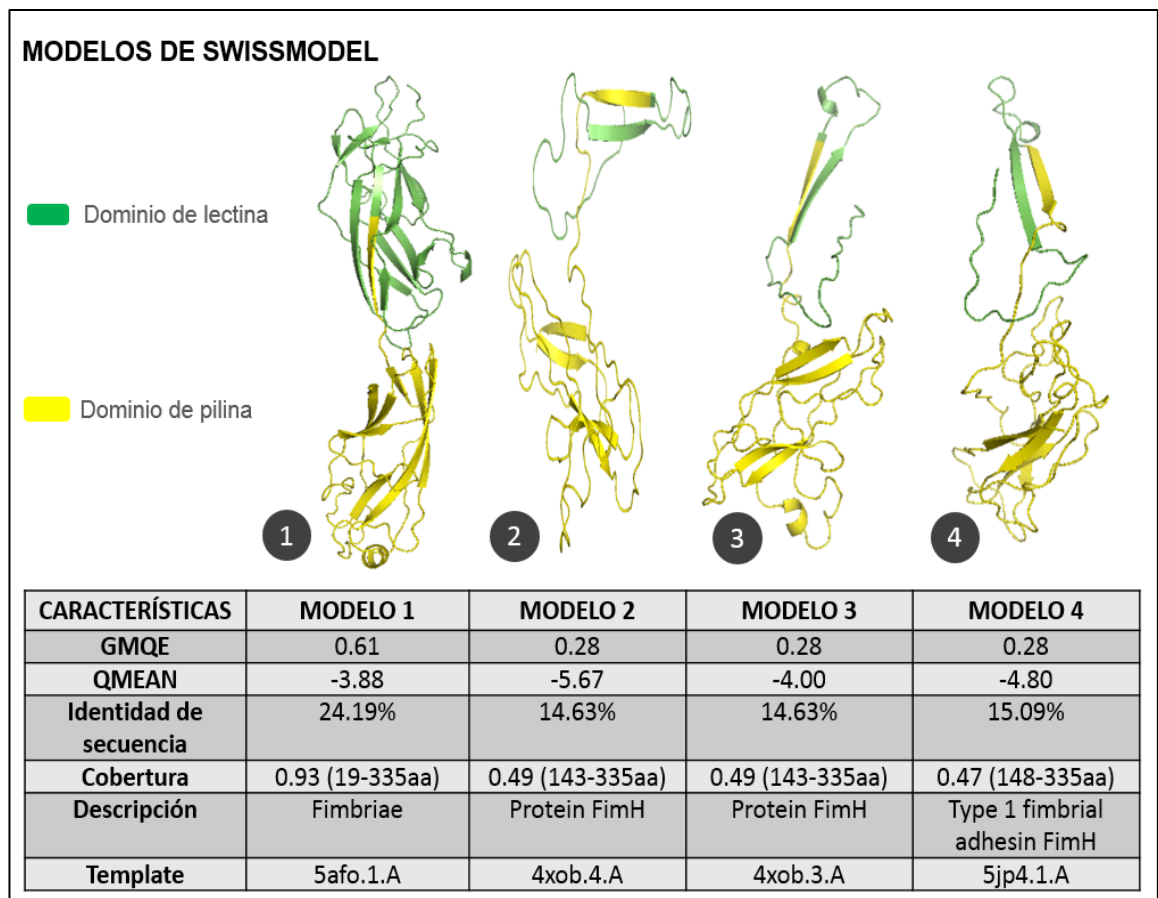


Figura N°6. Modelos de SWISS-MODEL.

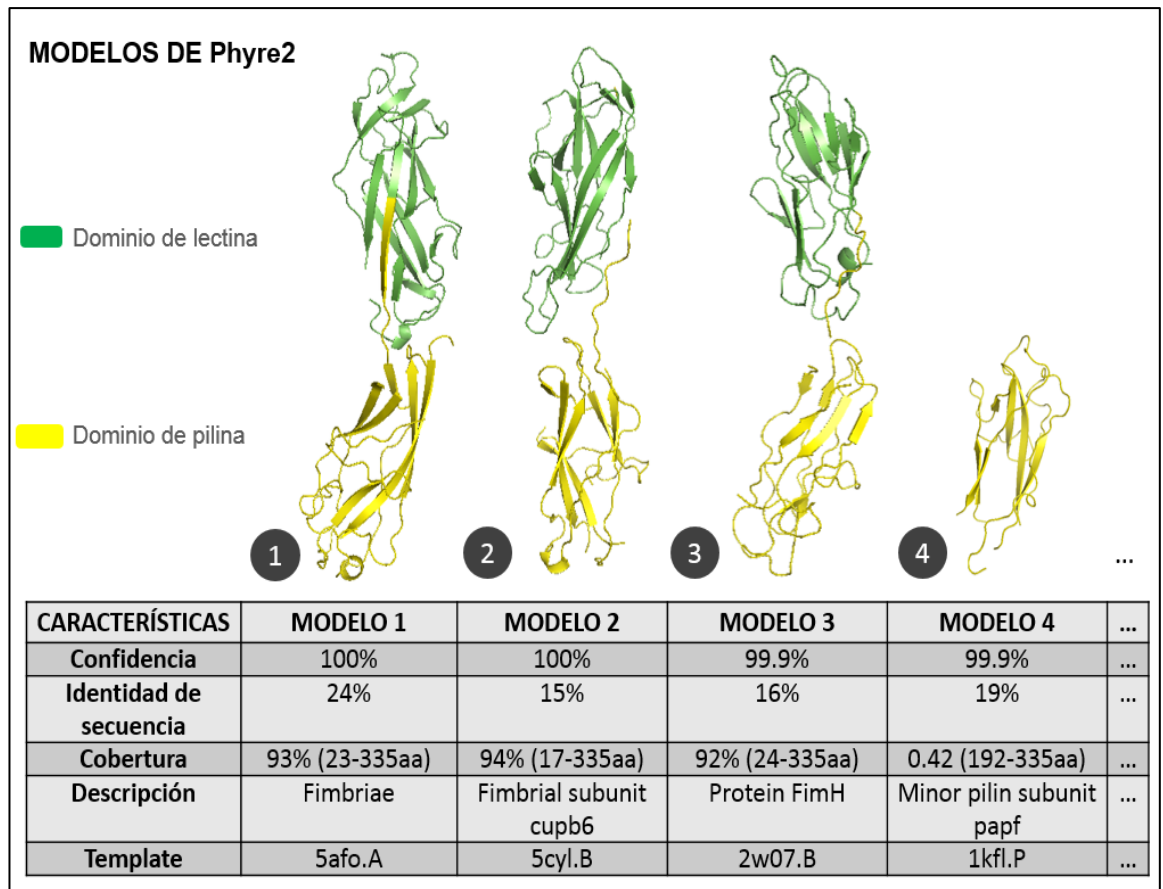


Figura N°7. Modelos de Phyre2.

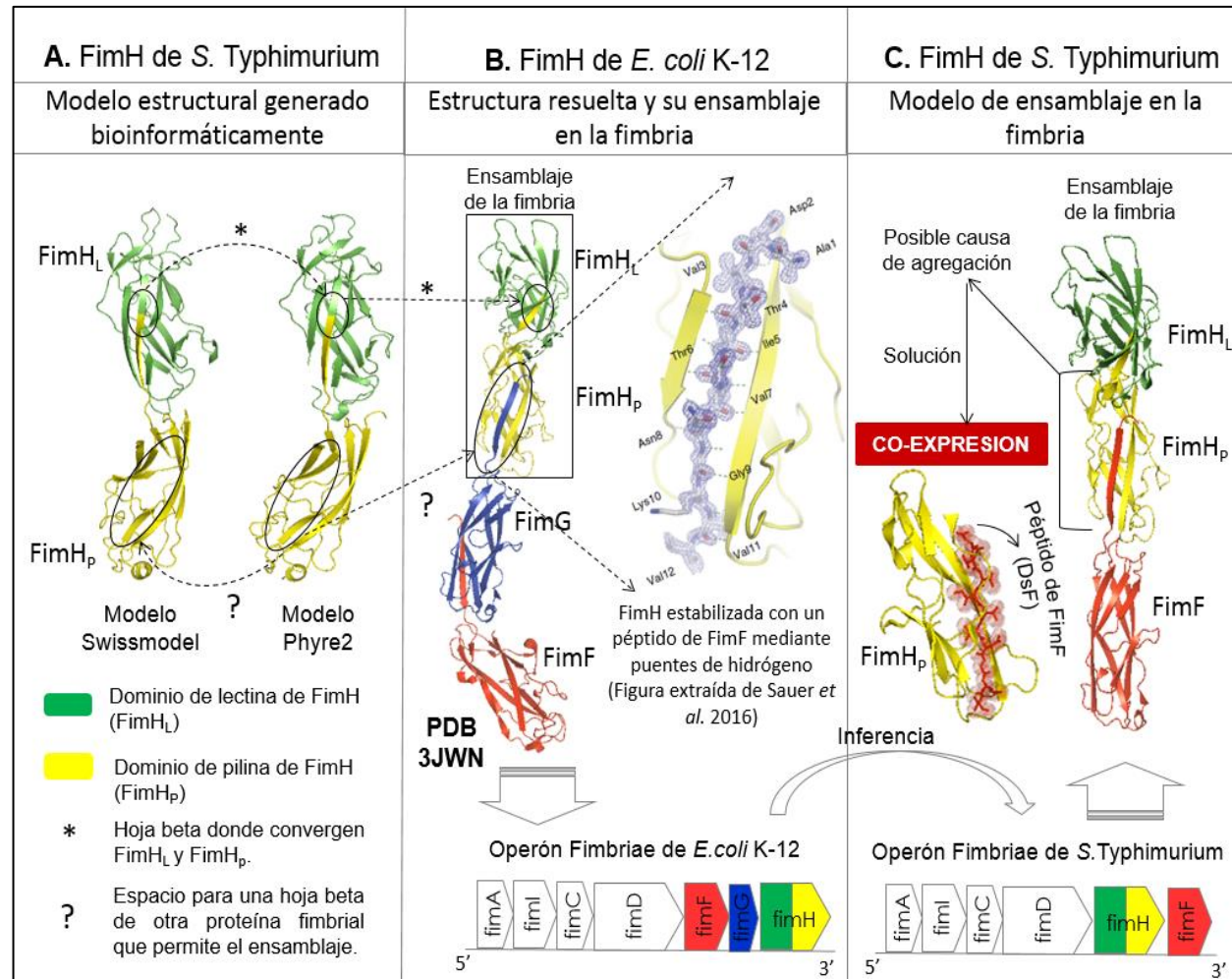


Figura N°8. Comparación de los modelos estructurales generados de FimH de *S. Typhimurium* con una estructura resuelta de *E. coli*.

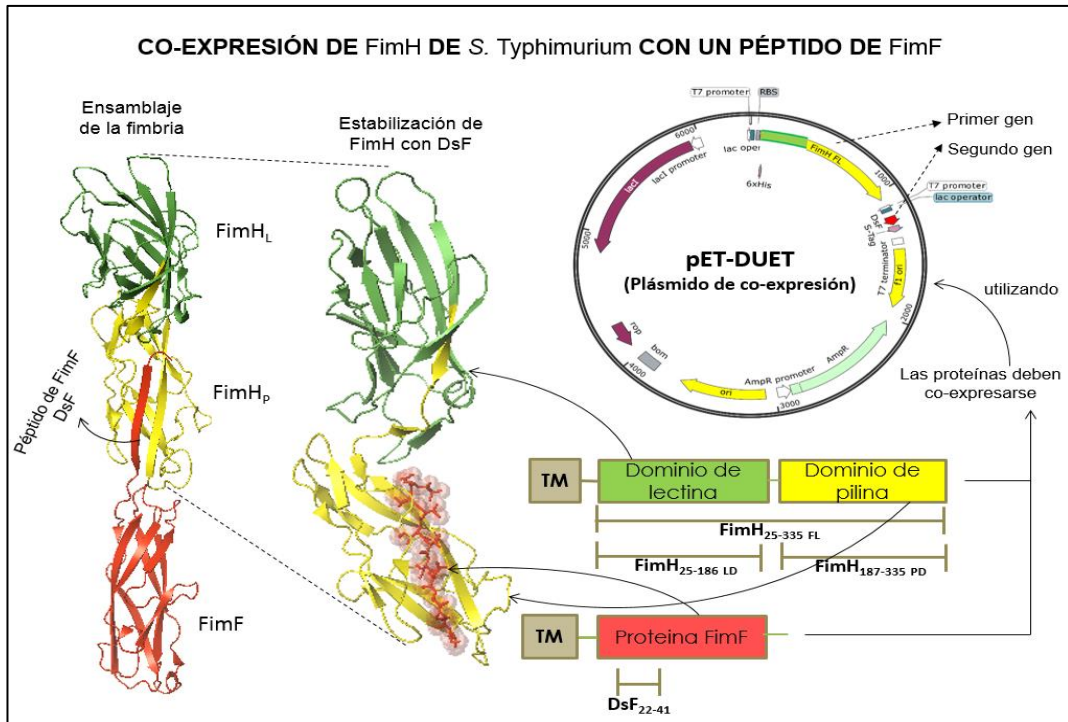


Figura N°9. Co-expresión de FimH con un péptido de FimF.

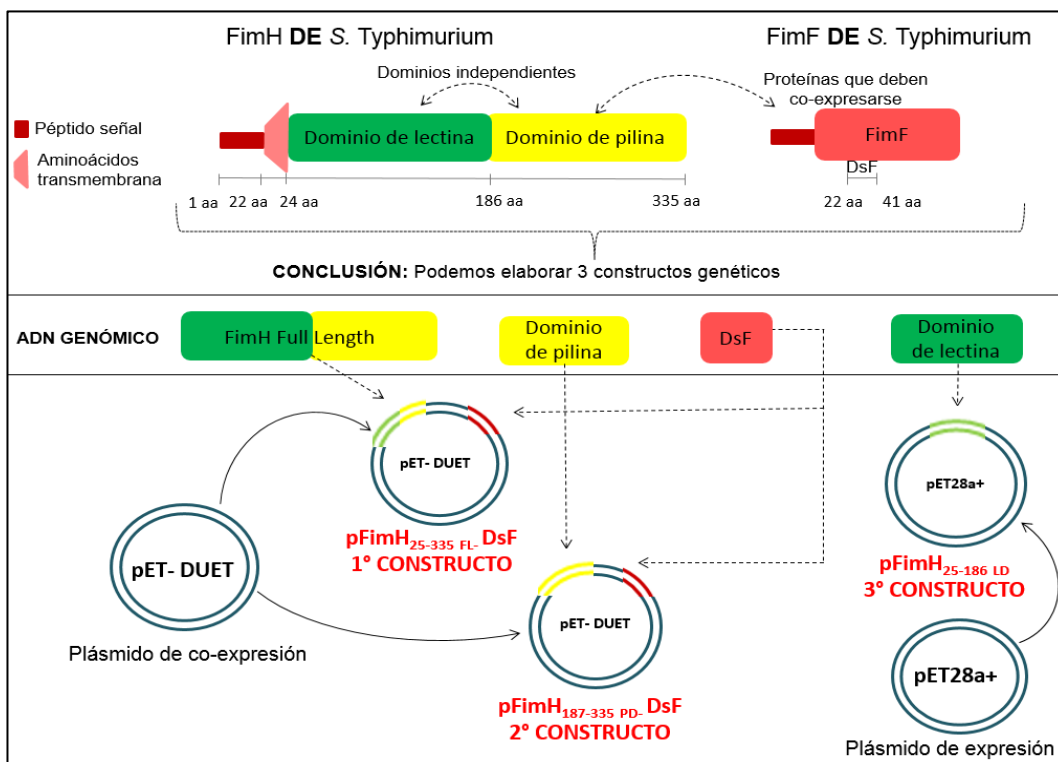


Figura N°10. Determinación de las secuencias nucleotídicas a clonar en los plásmidos pET-DUET y pET28a⁺.

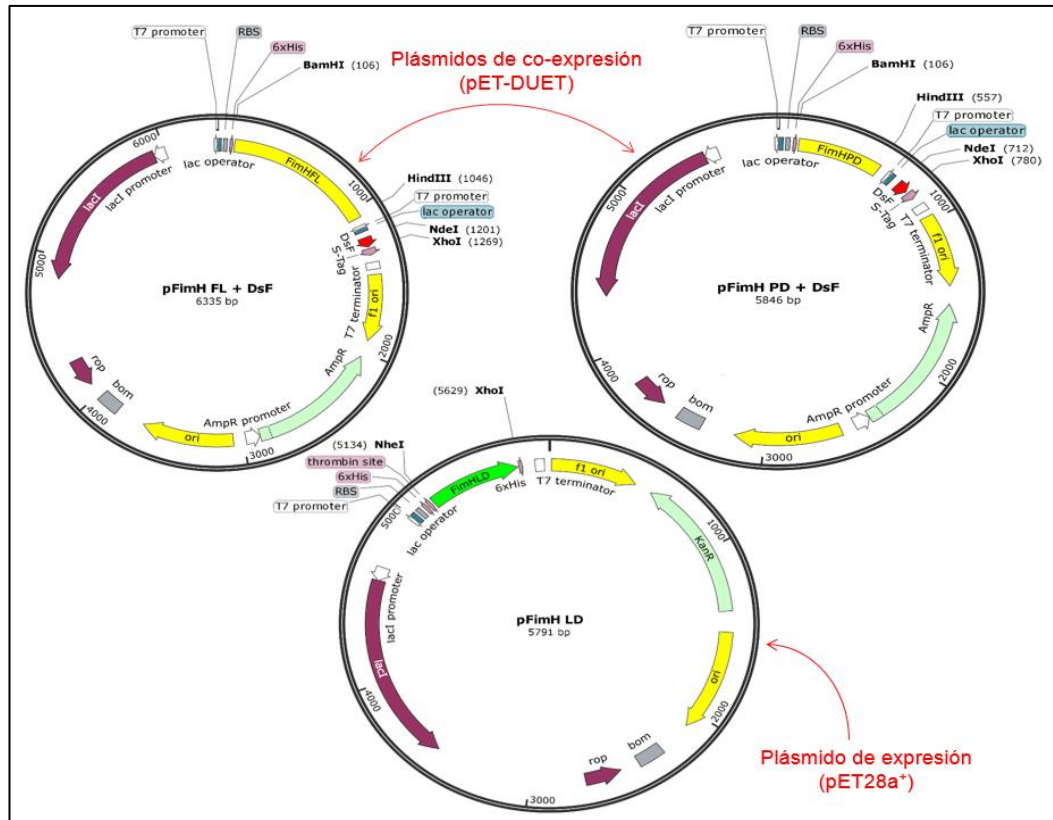


Figura N°11. Construcción *in silico* de los plásmidos.

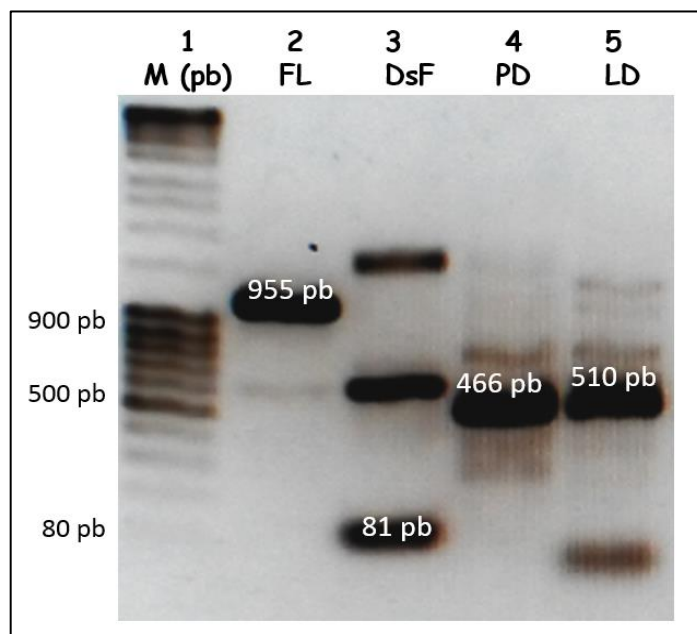


Figura N°12. Corrida electroforética de las secuencias nucleotídicas de interés del genoma de *S. Typhimurium*. Carril 1: Marcador de 10 000pb (MassRuler™ DNA Ladder mix), carril 2: amplicón de *fimH*₂₅₋₃₃₅FL (955 pb), carril 3: amplicón de *dsF* (81 pb), carril 4: amplicón de *fimH*₁₈₇₋₃₃₅PD (466 pb) y carril 5: amplicón de *fimH*₂₅₋₁₈₆LD (510 pb).

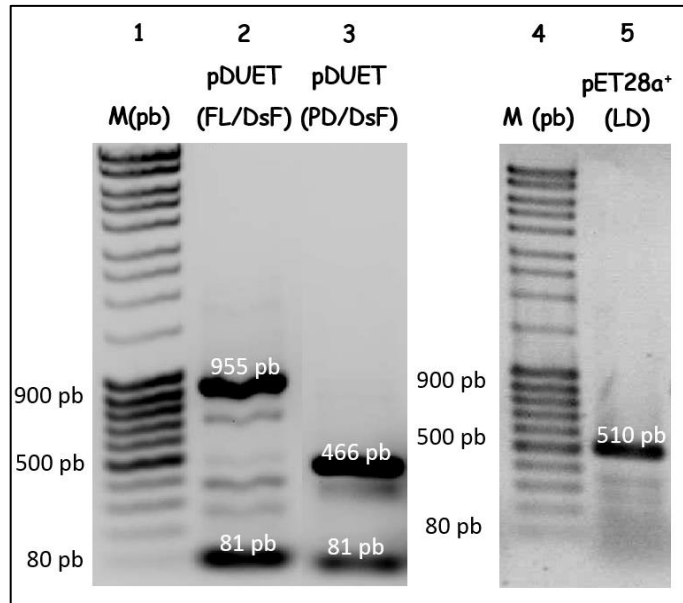


Figura N°13. Corrida electroforética de las secuencias nucleotídicas de interés de los plásmidos construidos. Carril 1: Marcador de 10 000pb (MassRuler™ DNA Ladder mix), carril 2: amplicones de *fimH*_{25-335FL} (955 pb) y *dsF* (81 pb), carril 3: amplicones de *fimH*_{187-335PD} (466 pb) y *dsF* (81 pb) y carril 4: amplicón de *fimH*_{25-186LD} (510 pb).

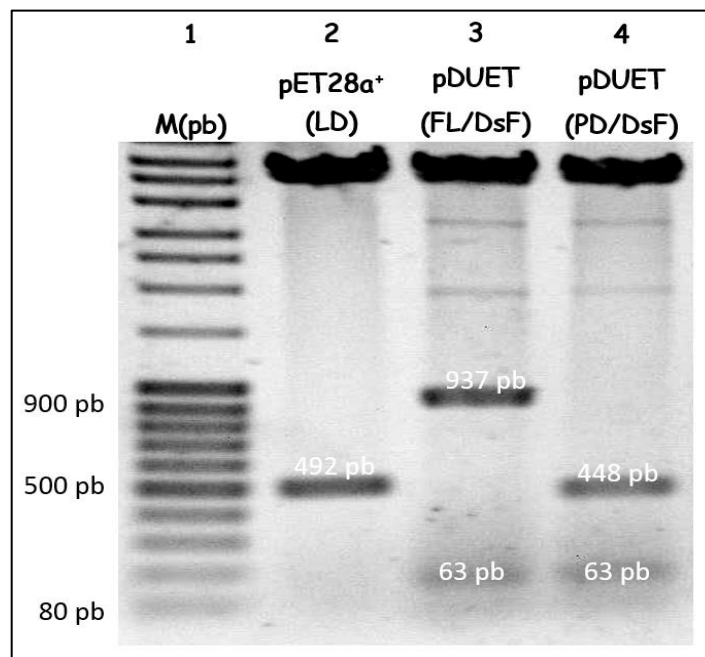


Figura N°14. Corte con enzimas de restricción de los plásmidos construidos. Carril 1: Marcador de 10 000pb (MassRuler™ DNA Ladder mix), carril 2: banda correspondiente a *fimH*_{25-186LD} (492 pb), carril 3: bandas correspondientes a *fimH*_{25-335FL} (937 pb) y *dsF* (63 pb), carril 4: bandas correspondientes a *fimH*_{187-335PD} (448 pb) y *dsF* (63 pb).

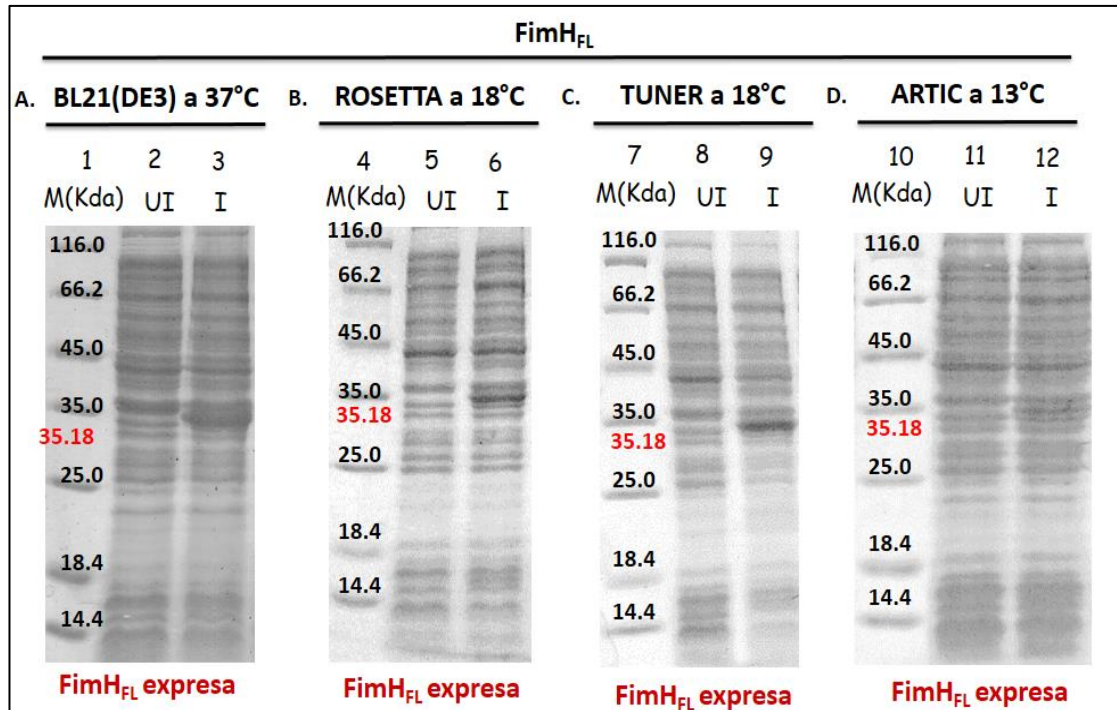


Figura N°15. Ensayos de expresión de la proteína FimH_{25-335FL}. Carril 1, 4, 7 y 10 (M(Kda)): Marcador de 10 000pb (MassRuler™ DNA Ladder mix), carril 2,5,8 y 11 (UI): Expresión en cepas no inducidas, carril 3,6,9 y 12: Expresión en cepas inducidas.

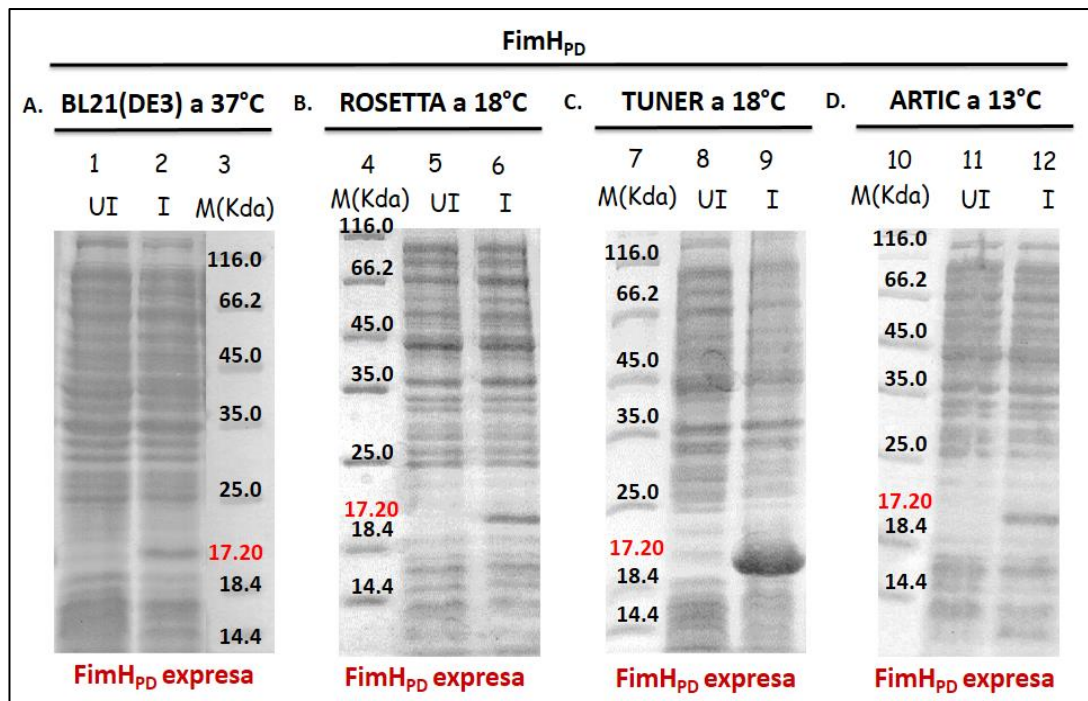


Figura N°16. Ensayos de expresión de la proteína FimH_{187-335PD}. Carril 1, 4, 7 y 10 (M(Kda)): Marcador de 10 000pb (MassRuler™ DNA Ladder mix), carril 2,5,8 y 11 (UI): Expresión en cepas no inducidas, carril 3,6,9 y 12: Expresión en cepas inducidas.

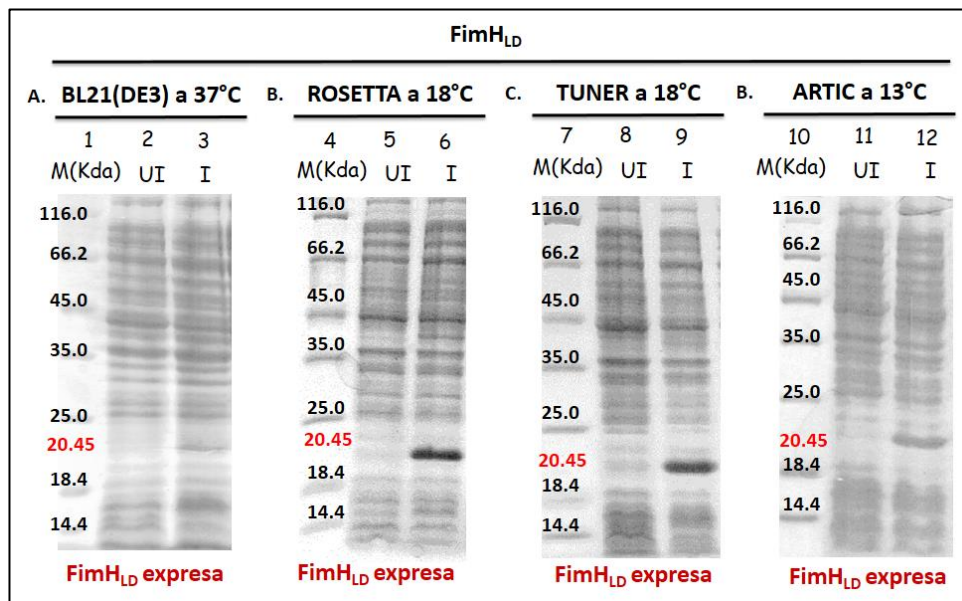


Figura N°17. Ensayos de expresión de la proteína FimH_{25-186LD}. Carril 1, 4, 7 y 10 (M(Kda)): Marcador de 10 000pb (MassRuler™ DNA Ladder mix), carril 2,5,8 y 11 (UI): Expresión en cepas no inducidas, carril 3,6,9 y 12: Expresión en cepas inducidas.

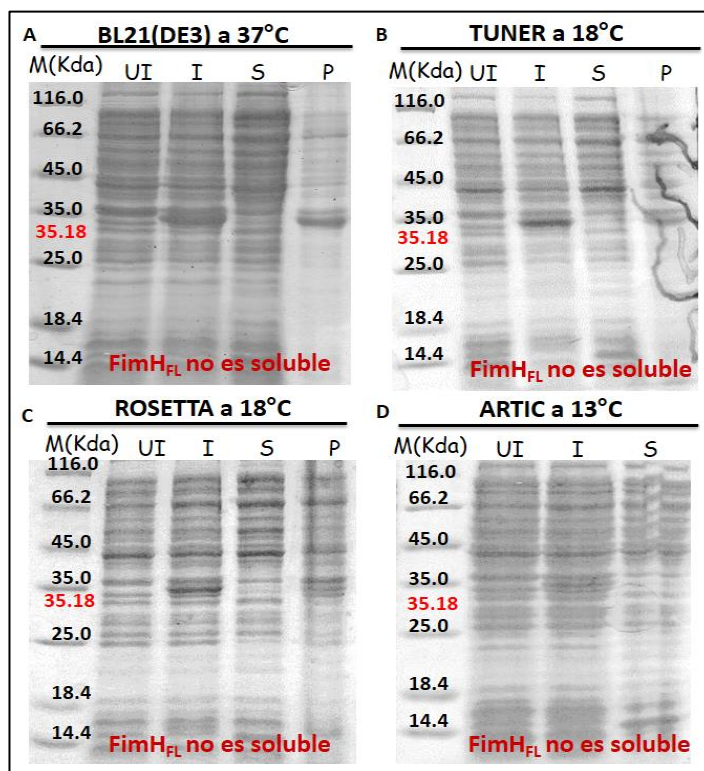


Figura N°18. Ensayos de solubilidad de la proteína FimH_{25-335FL}. M(Kda): Marcador de 10 000pb (MassRuler™ DNA Ladder mix), UI: Expresión de cepas no inducidas, I: Expresión de cepas inducidas, S: Fracción soluble y P: Fracción insoluble.

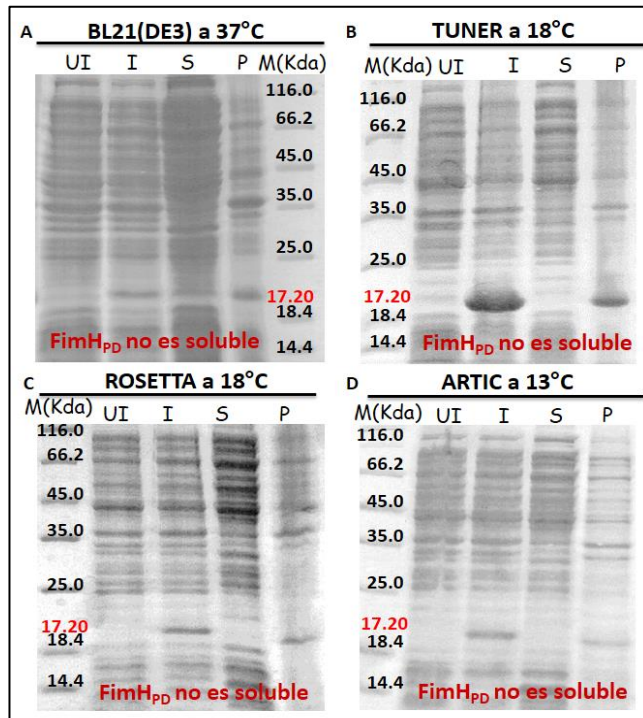


Figura N°19. Ensayos de solubilidad de la proteína FimH_{187-335PD}. M(Kda): Marcador de 10 000pb (MassRuler™ DNA Ladder mix), UI: Expresión de cepas no inducidas, I: Expresión de cepas inducidas, S: Fracción soluble y P: Fracción insoluble.

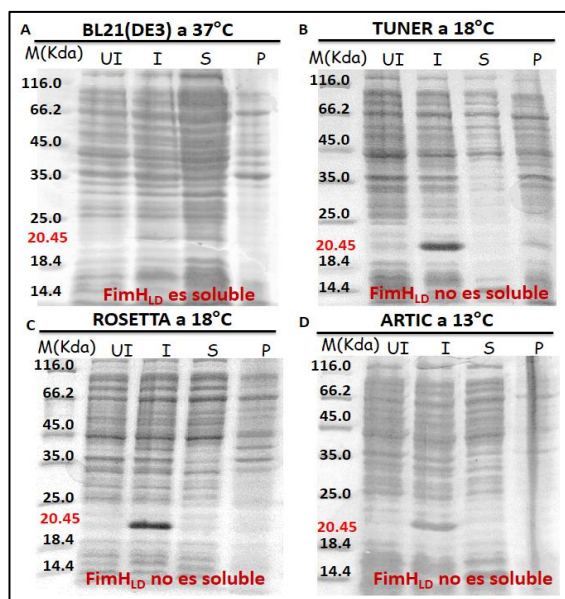


Figura N°20. Ensayos de solubilidad de la proteína FimH_{25-186LD}. M(Kda): Marcador de 10 000pb (MassRuler™ DNA Ladder mix), UI: Expresión de cepas no inducidas, I: Expresión de cepas inducidas, S: Fracción soluble y P: Fracción insoluble.

9.2. TABLAS

Tabla N°1. Tipos de fimbrias reportadas en *Salmonella*.

| Fimbria | Serovares | Dimensión | Adhesina | Subunidad mayor | Masa molecular (kDa) | Receptor |
|---|--|-----------|-------------------|-----------------|----------------------|--------------------------------|
| Tipo 1 (Sef21) | Varios | 8 nm | FimH | Fim | 21 | Manosa, fibronectina, laminina |
| Tipo 2 | <i>S. gallinarum</i> ^d <i>S. pullorum</i> ^e | 8 nm | Ausente | | | |
| Tipo 3 | <i>S. typhimurium</i> y otras? | | MrkD-like | ? | | Colágeno tipo V |
| SEF17 | Varios | 4 nm | AgfA ^a | | 17 | fibronectina |
| SEF14 | Grupo D y otras? | Delgado | SefA | SEF | 14 | ? |
| SEF18 | Todos | 2 nm | SefD | SEF | 18 | ? |
| Pef ^b adherencia a enterocitos | <i>S. enterica</i> serovar <i>Typhimurium</i> | | PefA | | 15 | ? |
| LPF ^c Adherencia a células M | <i>S. typhimurium</i> <i>S. gallinarum</i> ^d | | LpfE | | | Manosa |

BFP (bundle-forming pilus) no ha podido ser confirmado *in vivo*

^aAgfA (thin agregative fimbria)

^bPef (fimbria encoded plasmid) adherencia a enterocitos

^cLPF (long polar fimbria)

^d*Salmonella enterica* serovar Gallinarum

^e*Salmonella enterica* serovar Pullorum

*Extraído de Figueroa y Verdugo, 2005.

Tabla N°2. Listado de primers utilizados

| Gen | | Primers completos* | Longitud (pb) | Tm (°C) | %C-G |
|----------------------------------|-----------|-----------------------------------|---------------|---------|------|
| <i>fimH</i> _{24-335FL} | Forward 1 | aaaggatccatgccgaattcaaacggac | 30 | 57 | 50 |
| | Reverse 1 | aaaaagcttatcataatcgactcgtagatagcc | 36 | 58 | 41 |
| <i>fimH</i> _{188-335PD} | Forward 2 | aaaggatccaagctacagcggcaagtg | 28 | 57 | 53 |
| | Reverse 2 | aaaaagcttatcataatcgactcgtagatagcc | 33 | 55 | 42 |
| <i>dsF</i> | Forward 3 | ccccatgaactcatctctggcgca | 26 | 53 | 53 |

| | | | | | |
|---------------------------------|-----------|-----------------------------------|----|----|----|
| | Reverse 3 | cccctcgagtcaggtaaaatccaccacgttac | 32 | 56 | 43 |
| <i>fimH</i> _{24-186LD} | Forward 4 | tttgctagctgccgtaattcaaacgggac | 29 | 57 | 50 |
| | Reverse 4 | tttctcgagtcaaattggtatataccggcgtgc | 32 | 59 | 48 |

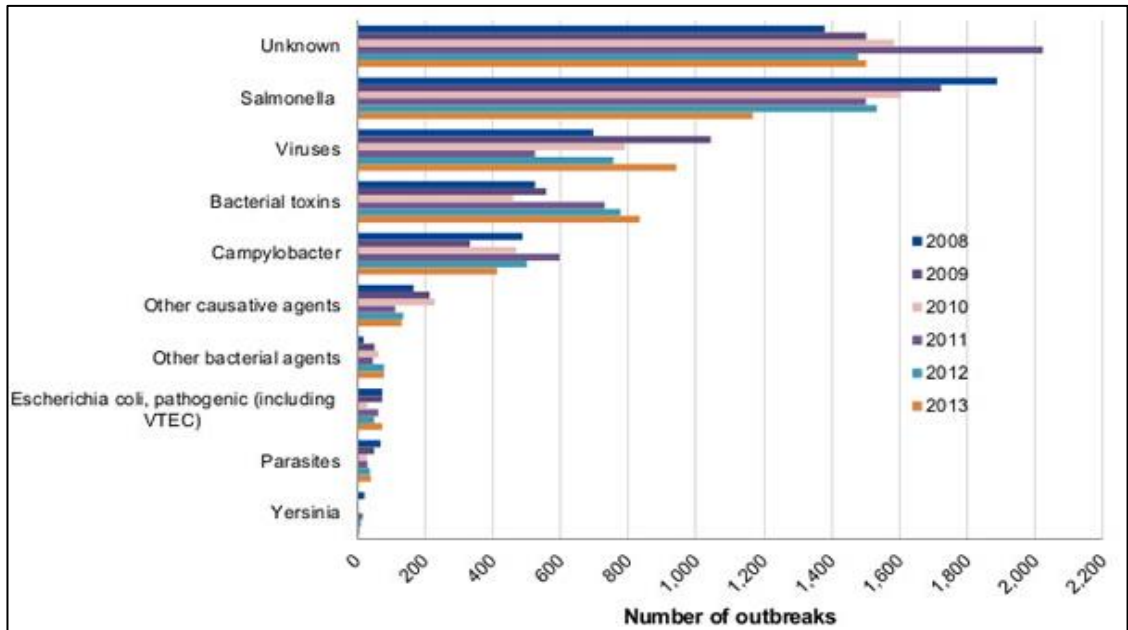
*Primers completos: Incluye la cola y la secuencia de sitio de corte de enzimas de restricción.

Tabla N°3.Características de los fragmentos proteicos

| Parámetro | Fragmentos proteicos | | |
|-----------------------|---|---|---|
| | <i>FimH</i> _{25-335FL} | <i>FimH</i> _{187-335PD} | <i>FimH</i> _{25-186LD} |
| Número de aminoácidos | 325 | 162 | 186 |
| Peso molecular | 35.182 KDa | 17.200 KDa | 20.453 KDa |
| pI teórico | 6.37 | 6.13 | 8.51 |
| Buffer adecuado | TRIS-HCl (pH=7.2) Glicerol 5% 100 Mm NaCL 20 Imidazol | TRIS-HCl (pH=7.2) Glicerol 5% 100 Mm NaCL 20 Imidazol | TRIS-HCl (pH=7.2) Glicerol 5% 100 Mm NaCL 20 Imidazol |

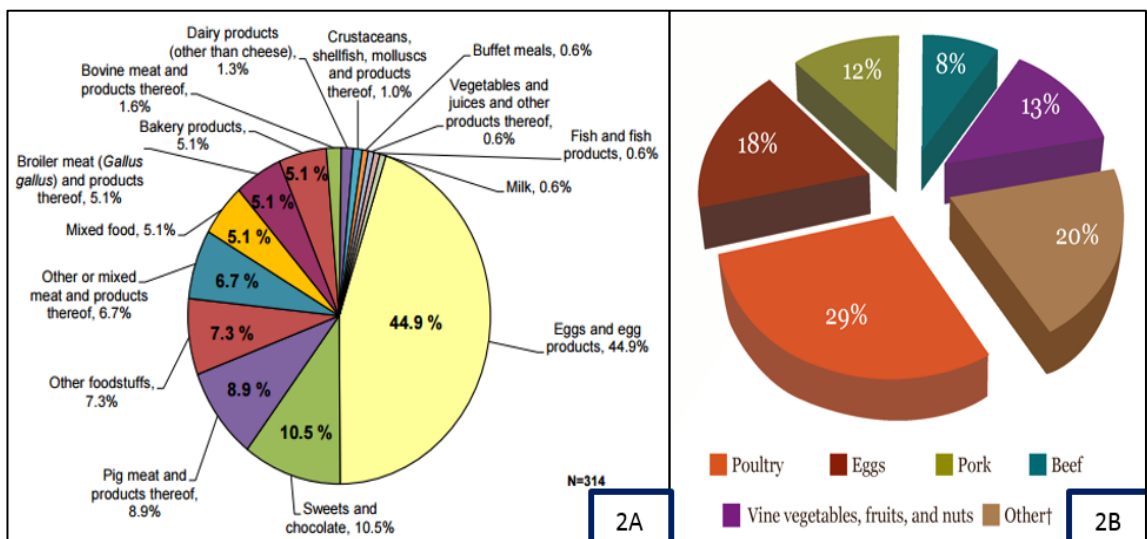
9.3. GRÁFICOS

Gráfico N°1. Incidencia de outbreaks transmitidos por alimentos.



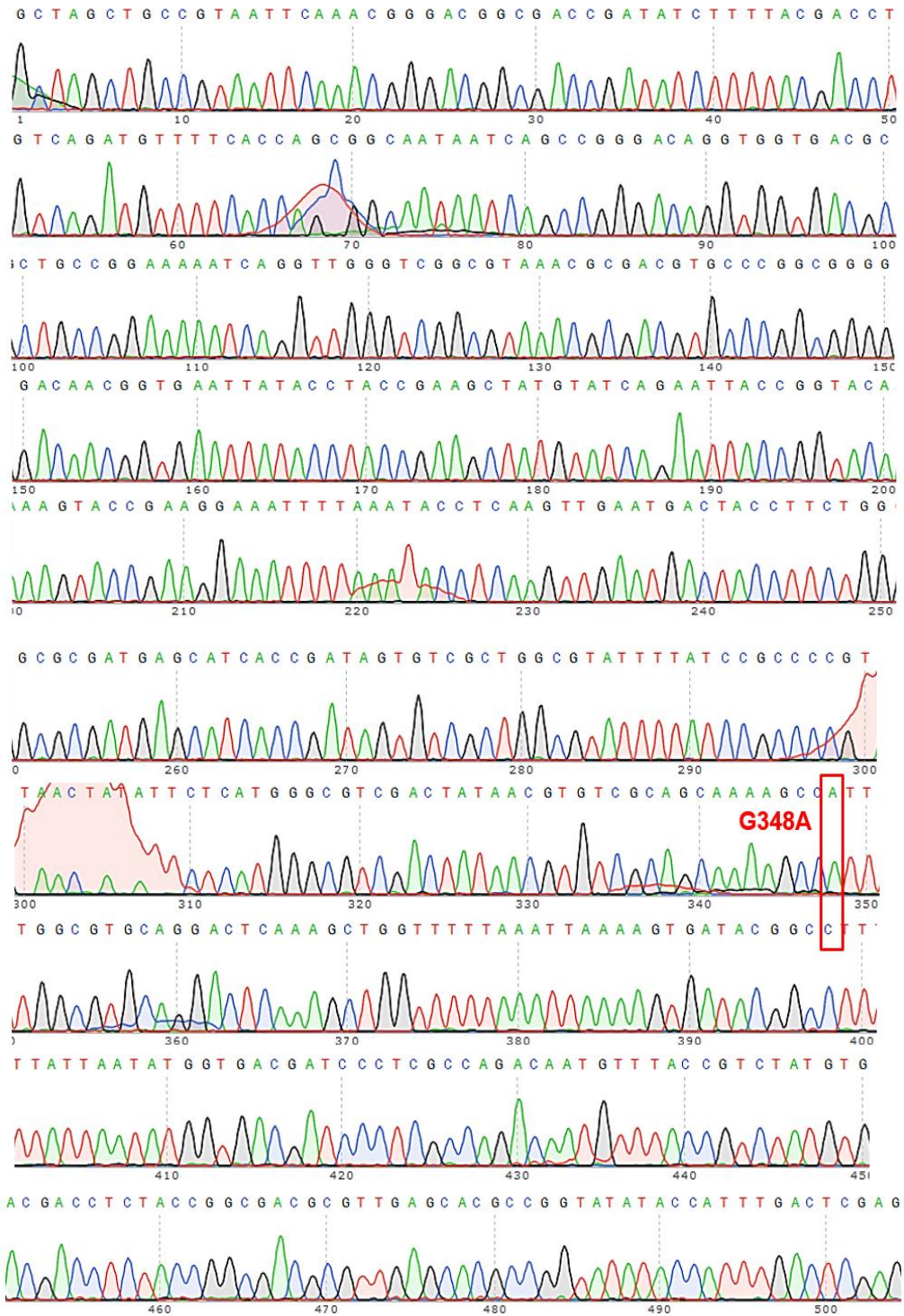
*Gráfico extraído de; European Food Safety Authority (EFSA) y European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC), 2015.

Gráfico N°2. Alimentos que originan los brotes causados por *Salmonella* en la Unión Europea (A) y Estados Unidos (B).



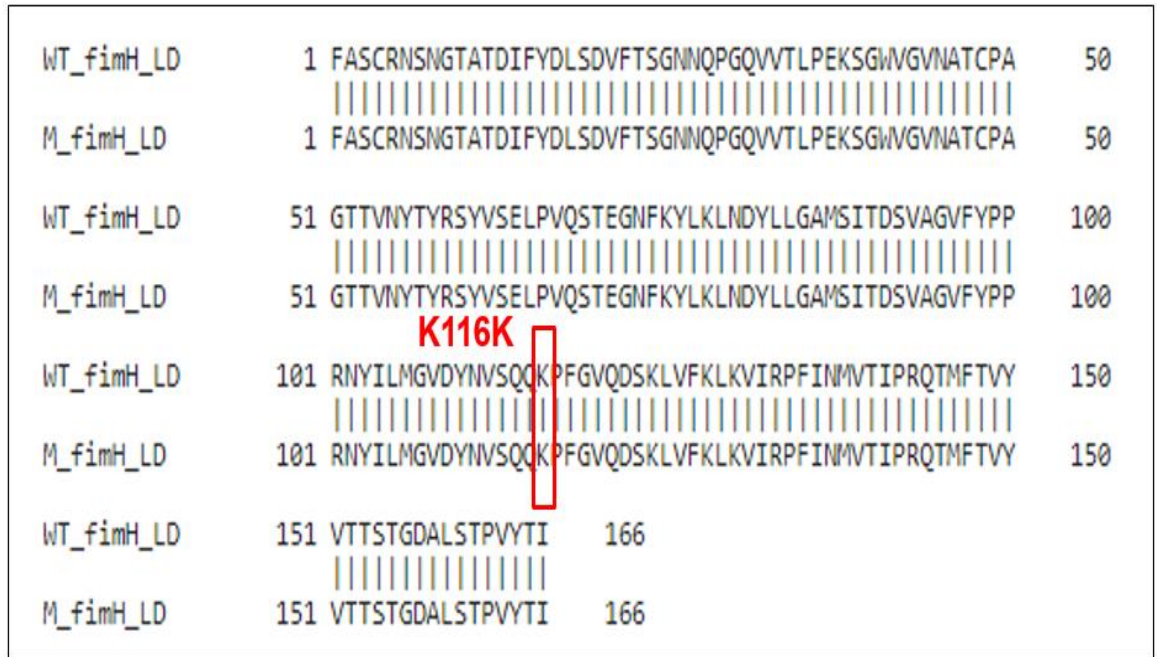
* Gráficos extraídos de; European Food Safety Authority (EFSA) y European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC), 2015 y Centre for Disease Prevention and Control in the E.E.U.U. (CDC), 2009.

Gráfico N°3. Secuenciamiento del gen *fimH*_{24-186LD}.



*Mutación puntual G3448A.

Gráfico N°4. La mutación G348A del gen *fimH*_{24-186LD} es una mutación silenciosa.



* *fimH*_{24-186LD} wild type (WT_ *fimH*_LD) y *fimH*_{24-186LD} mutante (WT_ *fimH*_LD).

Gráfico N°5. El secuenciamiento de *dsF* no fue factible.

